



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“Evaluación de los procesos de fitorremediación con
Ricinus communis L. y *Helianthus annuus L.* usando
bacterias promotoras del crecimiento vegetal”**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

Licenciatura en Ingeniería Ambiental

Presenta:

Mario Acosta Ortiz

Director de Tesis:

Dra. Maribel Castillo Morales

Co-director:

Dr. José Carlos Mendoza Hernández

Puebla, Pue. Noviembre 2018

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE IMÁGENES	4
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	5
INTRODUCCIÓN	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
JUSTIFICACIÓN	8
OBJETIVOS.....	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
HIPÓTESIS	10
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	11
1.1 Información general del sitio	11
1.2 Geografía	11
1.3 La minería en México.....	13
1.4 Fases del laboreo minero y contaminación.....	14
1.5 Contaminación del suelo.....	15
1.6 Dinámica de los metales pesados	15
1.7 Fases del proceso de incorporación y acumulación de metales pesados por plantas	17
1.8 Remediación de suelos contaminados con metales pesados.....	18
1.9 Mecanismos de las plantas ante la toxicidad del metal	19
1.10 Mecanismos de la fitorremediación.....	20
1.11 Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal.....	23
1.12 Función de las BPCV en suelos contaminados	24
1.13 <i>Ricinus communis</i> L.....	24
1.13.1 Descripción botánica	25
1.14 <i>Helianthus annuus</i> L	26

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA.....	26
2.1 Muestreo.....	26
2.2 Preparación de la muestra.....	28
2.3 Determinación de las características fisicoquímicas de la muestra de jal....	29
2.3.1 Porcentaje de saturación y pasta saturada.....	29
2.3.2 pH de la muestra de jal en solución de agua pura.....	29
2.3.3 Carbonatos.....	30
2.3.4 Bicarbonatos.....	31
2.3.5 Cloruros.....	31
2.3.6 Calcio.....	31
2.3.7 Magnesio.....	32
2.3.8 Acidez extraíble.....	32
2.3.9 Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).....	33
2.3.10 Textura.....	34
2.3.11 Nitrógeno.....	35
2.4 Cepas proporcionadas.....	36
2.4.1 Propagación y recuperación.....	37
2.4.2 Siembra de <i>Ricinus communis L.</i> y <i>Helianthus annuus L.</i> en sustrato orgánico Miracle Grow®.....	39
2.4.3 Siembra de <i>Ricinus communis L.</i> en jales.....	39
2.5 Determinación de los parámetros de crecimiento.....	40
2.6 Porcentaje de germinación de las plantas inoculadas con BPCV.....	41
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
3.1 Determinación de las características fisicoquímicas del jal.....	41
3.2 Determinación de los parámetros de crecimiento.....	44
3.3 Porcentaje de germinación de las plantas inoculadas con BPCV.....	50
Conclusiones.....	53
Bibliografía.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dinámica de los metales pesados en el suelo (García, C., et al., 2002).	17
Figura 2. Cartografía del lugar de muestreo, Zimapán Hidalgo.....	27
Figura 3. Clases texturales (USDA).	43

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Secado de la muestra jal.....	28
Imagen 2. Determinación de carbonatos.	30
Imagen 3. Determinación de bicarbonatos.....	31
Imagen 4. Determinación de calcio.....	32
Imagen 5. Determinación de acidez extraíble.	33
Imagen 6. Determinación de la capacidad de intercambio catiónico.....	34
Imagen 7. Determinación de la textura del jal.	35
Imagen 8. Determinación de nitrógeno total.	36
Imagen 9. Inóculos de las cepas 103, 107 y 129.	37
Imagen 10. Inóculos de las cepas 133, 143 y 144.	37
Imagen 11. Siembra de inóculos.....	38
Imagen 12. Recuperación de la biomasa bacteriana.	38
Imagen 13. Siembra de <i>Ricinus communis</i> L. y <i>Helianthus annuus</i> L. en sustrato.	39
Imagen 14. Siembra de <i>Ricinus communis</i> L. en jales.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características fisicoquímicas de jal minero de Zimapán, Hidalgo.	41
Tabla 2. Criterios para evaluar contenido de Nitrógeno Total (Moreno, 1978).....	44

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Crecimiento del tallo de Girasol en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®	45
Gráfica 2. Crecimiento de la raíz de Girasol en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®	46
Gráfica 3. Crecimiento del tallo de Higuierilla en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®	47
Gráfica 4. Crecimiento de la raíz de Higuierilla en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®	48
Gráfica 5. Crecimiento del tallo de Higuierilla en jal.....	49
Gráfica 6. Crecimiento de la raíz de Higuierilla en jal.	50
Gráfica 7. Porcentaje de germinación de semillas de Girasol en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®.....	51
Gráfica 8. Porcentaje de germinación de semillas de Higuierilla en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®.....	52
Gráfica 9. Porcentaje de germinación de semillas de Higuierilla en jal.....	53

INTRODUCCIÓN

La minería es una de las principales actividades económicas de mayor tradición, la cual se ha desarrollado por casi cinco siglos (Moreno, R., *et al.*, 2009) y siempre ha estado presente en el proceso histórico de México (Muñoz, 1986), ya que contribuye con más de 8% del Producto Interno Bruto en el país. Su cadena productiva tiene una contribución notable y geológicamente la geografía es importante por su riqueza mineral. México se encuentra dentro de los 12 principales productores a nivel mundial de 20 minerales, y es líder mundial en la producción de plata, ocupa el prestigioso segundo lugar en la producción de fluorita, tercero en la producción de bismuto, celestita y wollastonita; quinto sitio en la producción mundial de molibdeno, plomo y zinc; sexto en la producción de cadmio y selenio; séptimo en cobre y diatomita; octavo en oro y sal; noveno en manganeso y yeso; décimo en barita y fosforita y duodécimo sitio en bentonita y grafito (Servicio Geológico Mexicano, 2017). El estado de Hidalgo es una de las entidades federativas más importantes en este rubro, desde 2009 ha incrementado su explotación de plata, cobre, plomo, manganeso y zinc (Servicio Geológico Mexicano, 2014^a) los cuales son extraídos en diferentes municipios, entre ellos Zimapán (Servicio Geológico Mexicano, 2011).

La extracción minera a cielo abierto es por demás lesiva al desarrollo humano, insustentable ambientalmente hablando (García, F., 2012) debido a la generación de grandes cantidades de desechos denominados “jales mineros” (Covarrubias, S. & Peña, J., 2017) que son el producto de la trituración y molienda del mineral una vez que se han recuperado los metales comerciales mediante procesos físicos y químicos. Estos han generado un gran volumen depositados en presas, las cuales no han sido rehabilitadas o restauradas. Su composición puede ser muy diversa en su naturaleza tanto química como mineralógica constituida por calcosilicatos, sulfuros y sulfosales (Moreno, R., *et al.*, 2012). Los elementos presentes en jales que pueden ocasionar problemas por su alta toxicidad son el Ar, Cd, Cu, Pb, Hg: Cr, Se y Zn, los cuales son considerados Elementos Potencialmente Tóxicos (EPT),

desde el punto de vista ambiental (Moreno, R., *et al.*, 2012). Algunos otros como el Fe y el Mn aunque representan un riesgo menor, se considera que pueden tener efectos adversos a la salud (Medel, A., *et al.*, 2008), en general, los metales pesados pueden ser potencialmente tóxicos para la salud humana (Ortiz, H. G., *et al.*, 2009).

Por su parte, la actividad minera tiene mayor potencial para afectar al medioambiente (Oyarzún., *et al.*, 2011), ya que se ha beneficiado con la evolución tecnológica en el beneficio y la recuperación de metales, desde los procesos primitivos por amalgamación, cianuración, flotación, hasta los procesos modernos de lixiviación y fundición (Moreno, R., *et al.*, 2009).

Otro problema que puede causar es la contaminación del agua, suelo y sedimentos debido a que los contaminantes que se liberan al medioambiente son tanto de naturaleza orgánica (compuestos xenobióticos tóxicos y persistentes), como inorgánica (por ejemplo, los metales pesados) (Kidd, P. S., *et al.*, 2007) y es común que en sitios cercanos a minas y fundiciones de metales se encuentren áreas extensas contaminadas por dichos elementos capaces de alterar a los ecosistemas, además, estos no son biodegradables y pueden bioacumularse (Ruiz, E., & Armienta, M., 2012).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los rasgos característicos de la sociedad moderna es la creciente emisión al ambiente de sustancias contaminantes, destacando aquellas que proceden de las actividades mineras (Delgadillo, A., *et al.*, 2011) al obtener diferentes materias primas, metales y carbón para cubrir las demandas de la sociedad humana, (Xia & Cai., 2002), sus operaciones diarias modifican el paisaje circundante mediante la remoción de materiales previamente no perturbados (ELAW, 2007) tales como la

pérdida de tierras cultivables, bosques, pastizales, la degradación del suelo y paisaje, la contaminación del aire y agua (Xia & Cai., 2002).

Entre los principales problemas asociados a los sitios mineros se puede mencionar la generación de Drenaje Ácido de Roca (DAR) acompañado de la lixiviación de (EPT), principalmente en climas húmedos. Además de la contaminación de suelos por la dispersión eólica de contaminantes, en climas semiáridos (Moreno, *et al.*, 2012).

Los suelos que quedan tras una explotación minera contienen todo tipo de materiales residuales, escombros estériles, entre otros, lo que representa graves problemas para el desarrollo de la cubierta vegetal, sus características más notables son las siguientes: clase textural desequilibrada, ausencia o baja presencia de la estructura edáfica, propiedades químicas anómalas, disminución o desequilibrio en el contenido de nutrientes fundamentales, ruptura de los ciclos biogeoquímicos, baja profundidad efectiva, dificultad de enraizamiento, baja capacidad de cambio, baja retención de agua y presencia de compuestos tóxicos (Puga, S., *et al.*, 2006).

Por otra parte, las plantas y organismos que habitan en áreas contaminadas tienen serias dificultades para desarrollarse debido al pH extremo, falta de materia orgánica, bajo contenido de nitrógeno y nutrientes, baja capacidad de intercambio de cationes y altas concentraciones de metales. Otro problema importante que afecta a los suelos es el drenaje ácido de la mina, ya que es una fuente peligrosa de contaminación del agua, a pesar de estos impactos la sociedad humana no puede prescindir de la industria minera (Xia & Cai., 2002).

JUSTIFICACIÓN

El proceso minero en su conjunto, al considerar todas sus fases, desde la exploración, prospección, extracción, hasta el cierre, produce grandes cantidades de desechos de los que hay que disponer a costos elevados. El destino final de los residuos es de dos tipos; 1) el de la presa de jales para los residuos del proceso de beneficio, y 2) el de los terreros para los materiales producto del descapote (SGM, 2017). Esta actividad tiene diversos impactos ambientales y el más evidente es en el paisaje, el cual incluye modificaciones físicas (visuales), en recursos hídricos y en la biota (Carrillo, R., & González, M.C.A., 2017).

Actualmente se necesitan alternativas sostenibles para minimizar estos impactos generados por la industria minera, como restaurar y recuperar áreas degradadas durante el período funcional de la mina (Xia & Cai., 2002). Los métodos convencionales suelen ser costosos y pueden afectar de manera irreversible las propiedades del suelo, agua y de los seres vivos que en ellos habitan, por lo que la fitorremediación representa una alternativa sustentable y de bajo costo para la rehabilitación de ambientes afectados por contaminantes naturales y antropogénicos. Utiliza las plantas para remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o estabilizar contaminantes (Delgadillo, A., *et al.*, 2011).

Como estrategia para aumentar el establecimiento de plantas se propone utilizar la actividad microbiana de la rizosfera en conjunto con las especies vegetales; a esto se le llama *fitorremediación asistida por microorganismos*, la asociación de plantas con microorganismos puede mejorar la eficiencia de la fitorremediación debido a que estos son capaces de alterar la biodisponibilidad de los EPT, mejorando la tolerancia de las plantas y la producción de su biomasa. Asimismo, metabolitos producidos por estas bacterias, tales como el ácido indolacético (AIA), los sideróforos y algunos ácidos orgánicos, además de enzimas que alteran los niveles de hormonas en las plantas, tienen funciones destacadas en la absorción de nutrientes, el control de organismos patógenos, la elongación celular, la regulación de la actividad metabólica de la raíz y mejoran los procesos de desintoxicación de

EPT. A este tipo de microorganismos se les denomina Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) y de manera general promueven el crecimiento de las plantas en forma directa. Este proceso en sitios contaminados con EPT depende de variables específicas del sitio a restaurar, tales como características del suelo, niveles de contaminación, tipo de vegetación y clima (Perea, Y. S., *et al.*, 2017).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desempeño de *Ricinus communis L.* (Higuerilla) y *Helianthus annuus L.* (Girasol) en un proceso de fitorremediación asistido con bacterias promotoras del crecimiento vegetal en sustrato orgánico comercial Miracle Grow® y jales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar las características fisicoquímicas de los jales, previas a la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
- b) Propagación y recuperación de las cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal proporcionadas.
- c) Evaluar los parámetros de crecimiento de *Ricinus communis L.* y *Helianthus annuus L.* en sustrato orgánico comercial Miracle Grow® y jales.
- d) Conocer el porcentaje de germinación de las plantas inoculadas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal, en sustrato orgánico comercial Miracle Grow® y jales.

HIPÓTESIS

H₀: El uso de cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal en sustrato orgánico y jales no favorece a los factores de crecimiento y al porcentaje de germinación de las plantas de *Ricinus communis L.* y *Helianthus annuus L.*

H₁: El uso de cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal en sustrato orgánico y jales favorece a los factores de crecimiento y al porcentaje de germinación de las plantas de *Ricinus communis L.* y *Helianthus annuus L.*

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 Información general del sitio

Gran parte del territorio que comprende Zimapán y otros municipios se encuentran entre llanuras, sierras y lomeríos (Menéndez, M.T., & Civera, M., 2011). El estado de Hidalgo se ha caracterizado por ser una entidad minera con un historial de 500 años de minería, es una de las entidades federativas más importantes en el desarrollo minero de México. Actualmente es un importante productor de manganeso en el país y ocupa el tercer lugar en la producción de cadmio y en menor proporción la extracción de oro, plata, plomo y zinc, estos últimos han incrementado sus extracciones durante el 2011 (Servicio Geológico Mexicano, 2016).

1.2 Geografía

El municipio de Zimapán tiene una superficie de 860.9 km² y su ubicación es estratégica, se localiza en la porción occidental del estado de Hidalgo, entre las coordenadas geográficas 19°47'00" y 20°50'00" de latitud norte, y de longitud oeste 98°27'00" y 99°30'00"; la altitud media del municipio es de 1,800 msnm.

La cabecera municipal de Zimapán está ubicada a 94 km en línea recta y al noroeste de la ciudad de Pachuca, Hidalgo., colindando al norte con el municipio de Pacula; al nororiente con Jacala; al oriente con Nicolás Flores; al suroriente con Ixmiquilpan; al sur con los municipios Tecozautla y Tasquillo; al poniente con el estado de Querétaro (Servicio Geológico Mexicano, 2008).

Los cerros circundantes tienen un aspecto sedimentario de calizas cretácicas grisáceas muy compactas y fértidas, pues sus estratos contienen fósiles y minerales que constituyen la composición geológica de la sierra Madre Oriental, y son precisamente las vetas de estos cerros las que han favorecido la existencia de las minas (Menéndez, M.T., & Civera, M., 2011).

Tres cadenas montañosas conforman la región serrana y atraviesan el territorio hidalguense por el centro con dirección sureste-noroeste. La primera cadena montañosa es propiamente la Sierra Madre Oriental, que cubre la mayor parte del estado y donde se localizan las sierras de Zimapán, Jacala, Zacualtipán y Pachuca. La segunda cadena montañosa se inicia en Tulancingo y se le une al núcleo central en el cerro de Agua Fría. La tercera va de Real del Monte a Pachuca continuando hacia el noreste.

Los climas del estado ofrecen marcados contrastes, desde la calurosa y húmeda Huasteca, o el clima semifrío, subhúmedo, en las inmediaciones de Pachuca, hasta el clima seco templado que podemos hallar en el Valle del Mezquital, o las bondades climáticas de Tecozautla, el clima regular es semicálido húmedo, con lluvias todo el año, la temperatura promedio es de 18° C y una precipitación media anual de 640 mm. El estado es rico en vegetación, particularmente en la región norte y noreste, donde las condiciones climáticas, el tipo de roca y la humedad juegan un papel importante, los tipos de vegetación que se tienen son: vegetación tipo selva-bosque-matorral, áreas de cultivo y pastizales naturales e inducidos (Servicio Geológico Mexicano, 2016).

1.3 La minería en México

México es reconocido a nivel mundial por las actividades de extracción de minerales que realiza, según el (Servicio Geológico Mexicano 2014^b) la producción de minerales metálicos del país en 2013 lo posicionó en primer lugar en producción de Plata (Ag) con el 22.1 % de producción a nivel mundial, así como cuarto lugar en producción de Plomo (Pb) con el 4.7%, quinto lugar en Cadmio (Cd) con 6.7%, sexto en Zinc (Zn) con el 4.8%, octavo en Oro (Au) con 4.2%, noveno en producción de Manganeso (Mn) con el 1.3% de la producción mundial, así como el décimo y décimo cuarto lugar en producción de Cobre (Cu) y Hierro (Fe) con el 2.7 y 0.7% respectivamente. El estado de Hidalgo aumentó su producción de Ag, Cd, Cu, Pb, Mn y Zn de 2009 a 2013 de manera continua y para 2010 existían 11 empresas en proceso de exploración o explotación dentro del estado de las cuales 6 se encontraban en el municipio de Zimapán con producción de hasta 1000 toneladas al día principalmente de Ag, Pb, Zn y Cu (Servicio Geológico Mexicano, 2016).

La extracción de minerales y metales es una actividad importante a nivel nacional, en el siglo pasado, gran parte de la minería se concentró en la extracción de metales tales como oro, plata, hierro, cobre, plomo, zinc, cromo, mercurio y otros necesarios para el desarrollo económico o industrial de la sociedad. No obstante, la disposición de los desechos generados en la actividad minera implica un riesgo significativo para el ambiente. El manejo inadecuado de estos desechos ha dado lugar a la migración de metales pesados al medio circundante, lo que contribuye a la contaminación del suelo, a la pérdida de nutrientes, a la destrucción del paisaje ecológico, a la contaminación de aguas subterráneas y a la disminución de la diversidad biológica (Noriega, L., *et al.*, 2016).

Mientras tanto la actividad minera se desarrolla a partir de 4 fases importantes las cuales tienen un impacto significativo al medio.

1.4 Fases del laboreo minero y contaminación

El origen de las afectaciones puede estar en cualquiera de las etapas de desarrollo del proyecto minero, aunque no todas tienen la misma intensidad, diversidad y significado, por lo tanto las fases del laboreo minero son 4 principales:

- a) *Exploración*: ósea la prospección e investigación del tipo de yacimiento y de sus características, así como de la evaluación de las reservas y del estudio de la viabilidad económica de explotarlo. De ella depende el diseño del tipo de explotación a realizar, ya sea mediante obras subterráneas o a cielo abierto.
- b) *Desarrollo y puesta en marcha del proyecto*: en esta fase destaca la preparación de los tiros y socavones, en el caso de la minería subterránea, o las labores denominadas de descapote-remoción de los materiales estériles que cubren la mineralización en el caso de las minas a cielo abierto o tajos; la construcción de vías de acceso a la mina, comunicaciones internas, obras de dotación de agua y de energía eléctrica y las instalaciones de superficie de la unidad minera.
- c) *Operación*: una primera fase implica la extracción propiamente de los minerales de valor económico; la segunda, el proceso de beneficio por molienda, concentración de minerales valiosos según diferentes métodos y eliminación de residuos líquidos y sólidos vía presas de jales o terreros.
- d) *Cierre o abandono*: que implica, teóricamente, la restauración y rehabilitación del sitio minero una vez finalizada la explotación.

El alcance y la gravedad de los problemas ambientales debidos a las operaciones mineras dependen de diversos factores como: las características geográficas del

sitio minero, el tipo de minado, la dimensión de la explotación, la antigüedad de la explotación, la clase de mineral explotado, el proceso de beneficio o tratamiento del mineral y el destino de los residuos finales, los cuales pueden llegar a tener efectos negativos principalmente al suelo (Coll, A., *et al.* 2002).

1.5 Contaminación del suelo

Para que exista una contaminación en este aspecto, la minería como cualquier otra actividad que desarrolla el hombre, lleva implícita una alteración de los ecosistemas originales y es, en mayor o menor medida, agresiva a la naturaleza. Las actividades extractivas hacen uso de los recursos del suelo y subsuelo en forma temporal, y si no se realizan las actividades de restauración y recuperación una vez concluida la explotación, las áreas abandonadas quedan en una situación de degradación que las imposibilita para ser aprovechadas en otras actividades u otros usos (Coll, A., *et al.* 2002).

Ligado a esto un suelo contaminado es considerado como aquel que ha superado su capacidad de amortiguación para una o varias sustancias y, como consecuencia, pasa de actuar como un sistema protector a ser causa de problemas para el agua, la atmósfera y/o los organismos. Al mismo tiempo, se modifican sus equilibrios biogeoquímicos, y aparecen cantidades anómalas de determinados componentes que causan cambios en sus propiedades físicas, químicas o biológicas, ya que de esta manera puede ser mucho más factible que exista movilidad de metales pesados en su estructura interna (García, C., *et al.*, 2002).

1.6 Dinámica de los metales pesados

Los metales pesados son importantes contaminantes ambientales, y su toxicidad es un problema de creciente importancia por razones ecológicas, evolutivas, nutricionales y ambientales. El término "metales pesados" se refiere a cualquier

elemento metálico que tiene una densidad relativamente alta y es tóxico o venenoso incluso a baja concentración (Shivashankara, K. S., 2016).

Son aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g/cm³ cuando están en forma elemental o cuyo número atómico es superior a 20, también incluyen metaloides, como el arsénico, que pueden inducir toxicidad a bajo nivel de exposición. Muestran una elevada tendencia a bioacumularse y a biomagnificarse a través de su paso por los distintos eslabones de las cadenas tróficas. En concentraciones elevadas, ocasionan graves problemas en el desarrollo, crecimiento y reproducción de los seres vivos.

Aunque son elementos naturales que se encuentran en toda la corteza terrestre, la mayor parte de la contaminación ambiental y la exposición humana es resultado de actividades antropogénicas (Tchounwou, P., *et al.*, 2012). Se pueden encontrar como iones libres en la disolución del suelo, adsorbidos en las partículas coloidales del mismo, formando complejos órgano-minerales solubles o precipitados en la fracción sólida del suelo. Entre las diferentes formas en que queda un metal pesado en el suelo existe un equilibrio dinámico, como se muestra en la Figura 1 sobre el que influirán grandemente las condiciones del medio, el tipo de planta y microorganismos que subsistan en el mismo. Los mecanismos de tolerancia varían entre las distintas especies de plantas y están determinados por el tipo de metal, eficiencia de absorción, traslocación y secuestro (García, C., *et al.*, 2002), lo que permite conocer la manera de como las plantas funcionan ante la incorporación y acumulación de metales pesados.

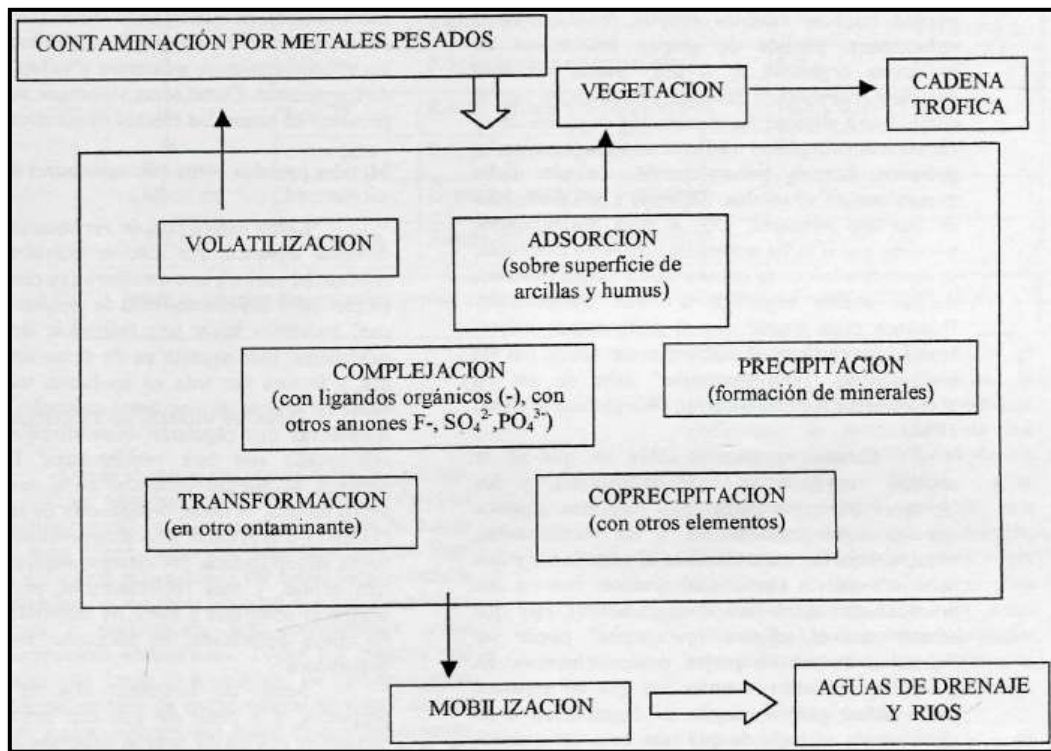


Figura 1. Dinámica de los metales pesados en el suelo (García, C., *et al.*, 2002).

1.7 Fases del proceso de incorporación y acumulación de metales pesados por plantas

En el proceso de incorporación de metales pesados a las plantas se realizan tres fases principales mediante las cuales estos elementos pasan del medio circundante al interior denotándose procesos de tipo metabólico específicos ante la presencia de los estresores.

En la primera fase se realiza el transporte de los metales pesados al interior de la planta y, después, al interior de la célula. La raíz constituye el tejido de entrada principal de los metales, los cuales llegan por difusión en el medio, mediante flujo masivo o por intercambio catiónico. La raíz posee cargas negativas en sus células, debido a la presencia de grupos carboxilo, que interaccionan con las positivas de

los metales pesados, creando un equilibrio dinámico que facilita la entrada hacia el interior celular, ya sea por vía apoplástica o simplástica.

En la segunda fase, una vez dentro de la planta, las especies metálicas son secuestradas o acomplejadas mediante la unión a ligandos específicos. Entre los quelantes producidos por las plantas se encuentran los ácidos orgánicos (ácido cítrico, oxálico y málico), algunos aminoácidos (histidina y cisteína) y dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metaloteínas.

En la última fase se realiza la compartimentalización y detoxificación, proceso por el cual, el complejo ligando-metal queda retenido en la vacuola (Delgadillo, A., *et al.*, 2011).

De esta manera puede existir una descontaminación de sitios alterados con EPT, llevando a cabo un proceso de remediación a través de la fitorremediación asistida con microorganismos.

1.8 Remediación de suelos contaminados con metales pesados

Para conseguir minimizar el problema de suelos contaminados se pueden aplicar diversas metodologías, si bien muchas de ellas no tratan de la eliminación directa del metal pesado, sino de su paso a formas no peligrosas (detoxificación del suelo) (García, C. *et al.*, 2002), la aplicación de la fitorremediación (*phyto = planta y remediación = mal por corregir*), es un proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos, sedimentos, y puede aplicarse tanto in situ como ex situ (Carpena, R., & Bernal, M., 2007) eficientemente para tratar suelos contaminados con compuestos orgánicos como Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xilenos (BTEX); solventes clorados; HAP's; desechos de nitrotolueno;

agroquímicos clorados y órganofosforados; además de compuestos inorgánicos como Cd, Cr(VI), Co, Cu, Pb, Ni, Se y Zn (Agudelo, L., *et al.*, 2005).

Estas aplicaciones se pueden clasificar en función del destino del contaminante: degradación, extracción, contención o una combinación de estas. Las aplicaciones de fitorremediación también se pueden clasificar en función de los mecanismos implicados. Dichos mecanismos incluyen la extracción de contaminantes del suelo o del agua subterránea; concentración de contaminantes en el tejido vegetal; degradación de contaminantes por diversos procesos bióticos o abióticos; volatilización o transpiración de contaminantes volátiles de las plantas al aire; inmovilización de contaminantes en la zona de la raíz; control hidráulico de agua subterránea contaminada (control de la pluma); y el control de la escorrentía, la erosión y la infiltración por cubiertas vegetativas (EPA, 2000).

Por otra parte, la selección de materiales vegetales es un factor importante para la fitorremediación de campo exitosa, aprovecha la ventaja de las capacidades de captación únicas y selectivas de los sistemas de raíces de las plantas, junto con las capacidades de translocación, bioacumulación y degradación de contaminantes en todo el cuerpo de la planta (Yashim, Z., *et al.*, 2016). Las plantas realizan diferentes mecanismos específicos para soportar y adaptarse a ambientes contaminados con presencia de EPT.

1.9 Mecanismos de las plantas ante la toxicidad del metal

Como todos los demás organismos, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos para mantener concentraciones fisiológicas de iones metálicos esenciales y para minimizar la exposición a metales no esenciales. La tolerancia de las plantas a un metal pesado en particular se rige por una red interrelacionada de mecanismos fisiológicos y moleculares, la comprensión de estos y su base genética es un aspecto importante para el desarrollo de las especies vegetales como agentes

de fitorremediación ya que desarrollan mecanismos constitutivos y adaptativos para resistir el exceso de metales pesados.

Algunos mecanismos son omnipresentes porque también son necesarios para la homeostasis general, minimizan el daño causado por las altas concentraciones de metales pesados en las plantas mediante la desintoxicación, lo que confiere tolerancia al estrés. Otros, se dirigen a iones metálicos individuales (de hecho, algunas plantas tienen más de un mecanismo para prevenir la acumulación de metales específicos), y estos procesos pueden implicar la exclusión de metales particulares del entorno intracelular o el secuestro de iones tóxicos dentro de los compartimentos para aislarlos de componentes celulares sensibles.

Como primera línea de defensa, muchas plantas expuestas a concentraciones tóxicas de iones metálicos intentan prevenir o reducir la absorción en las células de la raíz restringiendo los iones metálicos al apoplasto, uniéndolos a la pared celular o al exudado celular o inhibiendo el transporte a larga distancia. Si esto falla, los metales que ya están en la célula se abordan usando una variedad de estrategias de almacenamiento y desintoxicación, que incluyen inmovilización, síntesis de transportadores específicos de metales pesados, quelación, tráfico y secuestro por ligandos particulares (fitoquelatinas y metalotioneínas). Cuando estas opciones se agotan, las plantas activan los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo contrastando los efectos de las Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) y MG (como la regulación al alza del sistema antioxidante y glioxalaso) y la síntesis de proteínas relacionadas con el estrés y moléculas señalizadoras, como proteínas de choque térmico, hormonas, la biosíntesis de Pro, poliaminas y moléculas de señalización como el ácido salicílico y el óxido nítrico (Shivashankara, K. S., 2016).

1.10 Mecanismos de la fitorremediación

La fitorremediación es una tecnología emergente que utiliza diversas plantas para degradar, extraer, contener o inmovilizar contaminantes del suelo y el agua. Esta tecnología ha estado recibiendo atención últimamente como una alternativa innovadora y rentable a los métodos de tratamiento más establecidos que se usan en los sitios de desechos peligrosos (EPA, 2000). A continuación se presentan los mecanismos de la fitorremediación mediante los cuales se descontaminan sitios contaminados por causa de actividades antropogénicas.

Fitoextracción. Las raíces de las plantas pueden eliminar metales de suelos, sedimentos contaminados, transportarlos a las hojas y tallos para su recolección, eliminación o recuperación a través de procesos de fundición sin destruir la estructura del suelo y la fertilidad. Es el más adecuado para la remediación de áreas difusamente contaminadas, donde los contaminantes se producen solo a una concentración relativamente baja y superficialmente (Yashim, Z., *et al.* 2016).

Las formas de mejorar la eficacia de la fitoextracción incluyen aumentar la movilización de metales pesados, la solubilidad en el suelo y la biomasa de la planta promoviendo su crecimiento (Prapagdee, B., *et al.*, 2013).

Rizofiltración. Es la adsorción o precipitación en las raíces de las plantas. La absorción, concentración y translocación puede ocurrir, dependiendo del contaminante. Los exudados de las raíces pueden causar la precipitación de algunos metales. La rizofiltración primero da como resultado la contención de contaminantes, en la que estos se inmovilizan o acumulan dentro de la planta y se elimina de forma física (EPA, 2000).

Fitoestabilización. Ocurre a través de la microbiología y química de la zona de la raíz, y/o la alteración del ambiente del suelo. El pH del suelo puede ser modificado por los exudados de la raíz de la planta o por la producción de CO₂. La fitoestabilización puede cambiar la solubilidad y movilidad del metal o afectar la

disociación de compuestos orgánicos. El ambiente del suelo plantado puede convertir los metales de un estado de oxidación soluble a uno insoluble. La fitoestabilización puede ocurrir por sorción, precipitación, complejación o reducción de la valencia del metal. Las plantas se pueden usar para reducir la erosión del suelo contaminado con metales (EPA, 2000).

Rizodegradación. Es la descomposición de un contaminante orgánico en el suelo a través de la actividad microbiana que se potencia por la presencia de la zona de la raíz. La rizodegradación también se conoce como degradación asistida por plantas, biorremediación asistida por plantas, biodegradación in situ asistida por plantas y biodegradación mejorada de la rizosfera (EPA, 2000).

Fitodegradación, (también conocida como fitotransformación), es la descomposición de contaminantes absorbidos por las plantas mediante sus procesos metabólicos, o la descomposición de contaminantes externos a través del efecto de compuestos (como enzimas). Además, la degradación puede ocurrir fuera de la planta, debido a la liberación de compuestos que causan la transformación. Cualquier degradación causada por microorganismos asociados o afectados por la raíz se considera rizodegradación (EPA, 2000).

Fitovolatilización. Es la captación y transpiración de un contaminante por una planta, con la liberación o una forma modificada a la atmósfera a través de la absorción, el metabolismo y la transpiración de las plantas. La fitodegradación es un proceso de fitorremediación relacionado que puede ocurrir junto con la fitovolatilización (EPA, 2000).

Para hacer uso de un mecanismo de la fitorremediación y que este sea más eficiente, es necesario utilizar las ventajas que brindan las bacterias a través de su actividad metabólica en la parte de la rizosfera y específicamente aquellas que son promotoras del crecimiento vegetal.

1.11 Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

Estas cepas se caracterizan por su capacidad para: 1) colonizar la superficie de la raíz, 2) propagarse y sobrevivir en presencia de los microorganismos nativos del suelo y 3) estimular el crecimiento de la planta.

La promoción activa del crecimiento de la planta ocurre como consecuencia del suministro de nutrientes, tales como nitrógeno, fósforo y hierro (N, P, Fe) que no se encuentran disponibles en el suelo. La planta se suministra de N por medio de la fijación biológica de N atmosférico, mientras que la solubilización de minerales a través de la síntesis de ácidos orgánicos de bajo peso molecular permite la disponibilidad de P. Asimismo, la producción de sustancias quelantes, como los sideróforos, los cuales son compuestos de bajo peso molecular con alta constante para complejar hierro incrementa la disponibilidad de dicho elemento.

Distinguiéndose mecanismos directos que incluyen la producción de reguladores del crecimiento, como auxinas, giberelinas o bien, la alteración de la concentración de etileno en la planta por medio de enzimas como la 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa y por otra parte mecanismos indirectos de promoción de crecimiento ocurren cuando las BPCV previenen o reducen los efectos nocivos de los organismos patógenos, por ejemplo, los sideróforos pueden privar de Fe a los organismos fitopatógenos. Asimismo, mediante la síntesis de compuestos con efecto biocida, como el ácido cianhídrico, amoniacado y antibióticos. Al asociarse con bacterias, algunas plantas producen enzimas hidrolíticas que causan la lisis de la pared celular, lo que puede funcionar para controlar patógenos fúngicos. Aunado a esto, algunas BPCV provocan cambios físicos o químicos relacionados con la defensa de las plantas, a lo que se denomina Resistencia Sistémica Inducida (RSI). De manera general, en la mayoría de los casos las BPCV presentan más de un modo de promoción de crecimiento y específicamente funciones que permitan adaptarse a sitios contaminados (Perea, Y.S., *et al.*, 2017).

1.12 Función de las BPCV en suelos contaminados

La presencia de BPCV en suelos contaminados inducen cambios en la biodisponibilidad de EPT, y ocurren a través de reacciones óxido reducción, modificación de pH del medio y adsorción en la superficie bacteriana. Al estimular el crecimiento de las raíces con BPCV se obtiene mayor área superficial para la adsorción, y el aumento de la biomasa radical crea estabilidad física contra la erosión eólica e hídrica. También pueden mejorar la tolerancia a los EPT en las plantas.

Una estrategia que algunas bacterias han desarrollado para reducir el efecto tóxico de los EPT es la producción de sideróforos, estos compuestos pueden formar complejos estables con EPT tales como Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb y Zn aumentando su solubilidad, pero reduciendo su toxicidad. Otro mecanismo de reducción de la toxicidad de EPT es la transformación de las formas químicas del contaminante. Para que exista una mejor eficiencia por parte de las bacterias se prefiere usar microorganismos nativos del sitio a remediar porque además de presentar atributos como BPCV son organismos adaptados a las condiciones del sitio en comparación con los microorganismos no expuestos a estas condiciones (Perea, Y.S., *et al.*, 2017).

Así mismo para realizar el proceso de fitorremediación y dar cumplimiento a los objetivos específicos se utilizaron las plantas de *Ricinus communis L.* (Higuerilla) y *Helianthus annuus L.* (Girasol) las cuales tienen la capacidad de ser indicadoras y acumuladoras de elementos tóxicos.

1.13 *Ricinus communis L*

La *Ricinus communis L.*, comúnmente conocida como higuera o planta de aceite de ricino es una especie de planta de flores perteneciente a la familia de las Euphorbiaceae. La planta se extiende sobre áreas de suelo arenoso, riachuelos y barrancos. A menudo es abundante a lo largo de los cursos de agua y las llanuras de inundación, las tierras alteradas o derrochadas y los bordes de las carreteras con una alta tolerancia al crecimiento en condiciones ambientales adversas, como la escasez de lluvias y el calor. Es una planta apropiada para ser utilizada como planta indicadora de Cd y tolerante para Pb en solución contaminada y puede usarse potencialmente para la fitorremediación de áreas contaminadas (Yashim, Z., *et al.*, 2016).

1.13.1 Descripción botánica

Es un arbusto perenne de crecimiento rápido según las condiciones ambientales y puede alcanzar el tamaño de un árbol pequeño (alrededor de 12 metros o 39 pies), pero no es resistente al frío (Yashim, Z., *et al.*, 2016), su porte es erecto, la cual se puede clasificar por su altura en: altas (10 m), medianas (2 a 3 m) y enanas (menores de 2 m). Su tamaño tiende a ser mayor en climas tropicales y tierras fértiles (con materia orgánica superior al 5%). Las variedades enanas son de gran interés económico porque facilitan la cosecha mecánica.

La parte de la raíz es pivotante y profunda constituyendo el anclaje principal de la planta, presenta raíces secundarias y terciarias las cuales se encuentran en su mayoría a poca profundidad, el tallo principal es recto, seccionado por entrenudos que pueden ser de 11 a 20 cm, que en un inicio es relleno y con el tiempo se hace hueco. El diámetro puede variar de 3 a 15 cm., sus colores fundamentales son verde, rojo y caoba, algunas variedades muy ramificadas y otras sin ramificación, mientras que las hojas son alternas, pecioladas, palmeadas con 5 a 11 lóbulos, dentadas, con nerviación palmatinervia. Peciolos redondos de 18 a 60 cm de longitud; con dos glándulas nectaríferas en la unión con la lámina, dos glándulas en

la unión con el peciolo; la lámina de la hoja tiene 10 a 75 cm de diámetro y de un color acorde al del tallo.

La inflorescencia es la sección del raquis donde se encuentran las flores y también se le conoce como racimo. Es una planta monoica generalmente unisexual, o sea que en sus inflorescencias llevan las flores masculinas y femeninas, su proporción es variable, por lo general las flores femeninas se distribuyen en la región distal y las flores masculinas en la región basal del raquis (Rómulo, H., *et al.* 2011).

1.14 *Helianthus annuus L*

El Girasol (*Helianthus annuus L.*) es un cultivo importante en todo el mundo. Es una de las plantas más ampliamente estudiadas para la fitorremediación de metales pesados. Investigaciones con *Helianthus. annuus*, una conocida planta de acumulación de metal, han revelado que varios metales pesados, incluyendo plomo, cadmio, cobre, zinc y cobalto, se acumulan a altas concentraciones tanto en los brotes como en las raíces (Prapagdee, B., *et al.* 2013).

Pertenece a la familia de las Asteraceae, posee una facilidad de manejo en su cultivo, se adapta fácilmente a un amplio intervalo en la variación de temperatura. La época de la siembra es variable y depende de las características climatológicas de cada región. Es una planta anual, con un desarrollo vigoroso en todos sus órganos, dentro de esta especie existen numerosos tipos o subespecies cultivadas como plantas ornamentales, oleaginosas y forrajeras (Chico, J., *et al.* 2012).

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

2.1 Muestreo

Para realizar el muestreo se tomó como referencia la NORMA OFICIAL MEXICANA (NOM-021-SEMARNAT-2000), que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Se seleccionó el área de interés ubicado en el municipio de Zimapán Hidalgo, con coordenadas; 458372.78 m E y 2292926.58 m N, Figura 2.

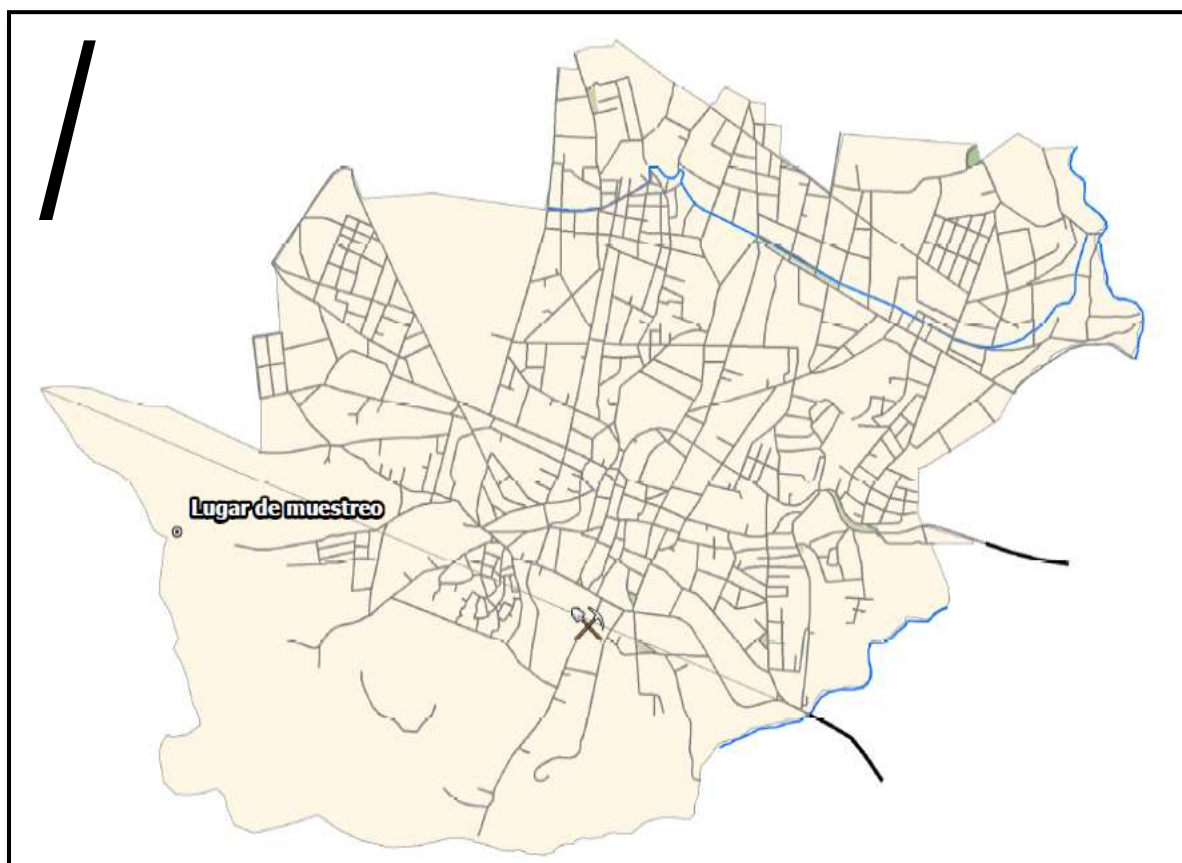


Figura 2. Cartografía del lugar de muestreo, Zimapán Hidalgo.

Aunque los métodos que utiliza esta norma son exclusivos para el análisis de suelos, se utilizó como apoyo debido a que se pretende conocer el estado actual del jal minero a través de la determinación de sus características fisicoquímicas, y de esta manera fomentar la conservación, protección, restauración y aprovechamiento del recurso suelo, mediante prácticas tendientes a prevenir el

deterioro de sus propiedades físicas, químicas y biológicas, ya que es el medio principal que sostiene e interactúa con el jal.

2.2 Preparación de la muestra

Siguiendo el método AS-01 de la NOM-021-SEMARNAT-2000 se llevó a cabo el traslado, recepción, registro, secado, molienda, tamizado y almacenamiento de la muestra.

Se utilizaron bolsas de plástico para el traslado de las muestras al laboratorio, indispensablemente se cuidaron las condiciones externas para evitar la alteración de su composición.

Se prosiguió con la identificación, registro y secado para lo cual se emplearon charolas de aluminio extendidas, en estos recipientes se colocó la muestra compuesta de jal y se dejó secar durante 24 horas en estufa a 30°C para retirar el exceso de humedad, Imagen 1.



Imagen 1. Secado de la muestra jal.

Una vez seca la muestra se sometió al proceso de molienda con el fin de tener la homogenización de las partículas. La muestra molida se hizo pasar por un tamiz de acero inoxidable con abertura de 2 mm (malla número 10). Se pesó 1 kg de jal aproximadamente para realizar los análisis fisicoquímicos y se almacenó en bolsas ziploc completamente cerradas y debidamente identificadas.

2.3 Determinación de las características fisicoquímicas de la muestra de jal

2.3.1 Porcentaje de saturación y pasta saturada

La determinación se realizó siguiendo el método AS-17 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.

En un recipiente de plástico con tapadera hermética se pesaron 100 g de jal seco con contenido de humedad conocido y se agregó agua destilada mezclando lo mejor posible hasta llegar al punto de saturación. Se tapó el recipiente y dejó reposar durante 24 horas para permitir que el jal embeba agua, se agregó más agua destilada hasta obtener una pasta de jal-agua uniformemente saturada.

Para la determinación del pH del extracto de saturación de la muestra obtenida a partir de la pasta saturada, se empleó el método AS-02 de la NOM-021-SEMARNAT-2000, el cual se basa en el método electrométrico.

Se vertieron 5 mL de muestra en vasos de precipitados de 50 mL, se introdujo el electrodo del pHmetro y se registró la lectura.

2.3.2 pH de la muestra de jal en solución de agua pura

Utilizando nuevamente el método AS-02 de la NOM-021-SEMARNAT-2000, el cual se basa en el método electrométrico se realizó la determinación del pH en la muestra de jal en una solución de agua pura.

Se pesaron 10 g de jal en un vaso de precipitados de 50 mL, posteriormente se adicionaron 20 mL de agua destilada y con un agitador magnético se mezcló el jal y agua a intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos. Se dejó reposar durante 15 minutos. Finalmente se agitó la suspensión y se registró la lectura de pH.

2.3.3 Carbonatos

La medición de la concentración de carbonatos se realizó por el método AS-20 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Se colocaron 5 mL del extracto de saturación de la muestra en un matraz Erlenmeyer y se sometió a agitación. Posteriormente se añadieron 5 gotas de fenolftaleína mientras se continuaba agitando y se observó si la solución se torna de color rosa, la falta de color significa ausencia de carbonatos. En caso de presencia de carbonatos se procedió a titular con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.05N hasta que desapareciera el color rosa como se muestra en la Imagen 2.



Imagen 2. Determinación de carbonatos.

2.3.4 Bicarbonatos

A la muestra proveniente de la determinación de carbonatos se añadieron 2 gotas de anaranjado de metilo y se sometió a agitación. La muestra se tituló con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.05N hasta tener un vire de amarillo a color canela, Imagen 3.



Imagen 3. Determinación de bicarbonatos.

2.3.5 Cloruros

Para la determinación de la concentración de cloruros presentes en el extracto de saturación se siguió el método AS-20 de la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Se tomó una alícuota de 5 mL del extracto de la pasta saturada y se depositó en un matraz para dejarlo en agitación. Se agregaron 10 gotas de indicador cromato de potasio (K_2CrO_4) y continuó agitando. Finalmente se tituló con nitrato de plata (AgNO_3) al vire de amarillo a rojo vinoso. Preparándose al mismo tiempo un blanco.

2.3.6 Calcio

En un matraz Erlenmeyer se colocó un agitador magnético y se agregó una alícuota del extracto de saturación, se agitó para agregar 5 gotas de carbamato, una gota de hidróxido de sodio (NaOH) y 7 mg de murexida, mezclando continuamente. Finalmente, se tituló con EDTA como se muestra en la Imagen 4. Preparándose al mismo tiempo un blanco.



Imagen 4. Determinación de calcio.

2.3.7 Magnesio

A la muestra que se tituló para calcio se agregaron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado (HCl) y se agito hasta que la murexida se dissociara. Después se agregaron 3 mL de solución buffer de cloruro de amonio-hidróxido de amonio (NH_4Cl NH_4OH) y se continuó agitando. Posteriormente se agregó 1 gota de indicador negro de Eriocromo T, finalmente se realizó la titulación usando EDTA al punto final de color azul.

2.3.8 Acidez extraíble

Se utilizó el método AS-32 de la NOM-021-SEMARNAT-2000 para determinar la acidez extraíble, esta acidez liberada del suelo se da a partir de una solución de BaCl_2 -TEA a pH 8.2.

Se pesaron 25 g de jal y se colocaron en el embudo con papel filtro para realizar la filtración de 50 mL de solución BaCl_2 -TEA. Se colectó el extracto y se agregaron 2 gotas de indicador rojo de metilo. Posteriormente se realizó la titulación con ácido clorhídrico HCl 1 N hasta el vire de color amarillo a rojo mostrado en la Imagen 5. Preparándose al mismo tiempo un blanco.



Imagen 5. Determinación de acidez extraíble.

La muestra de jal en el embudo se conservó para realizar la determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico.

2.3.9 Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)

Se tomó la muestra de jal procedente de la determinación de acidez extraíble y se hizo pasar agua desionizada. Después se filtraron 100 mL de acetato de sodio 0.1 M y se agregaron 20 mL de solución buffer al extracto. Posteriormente se agregó el

indicador negro de Eriocromo T y se tituló la muestra con EDTA hasta el vire de color rojo violeta a azul como se muestra en la Imagen 6.



Imagen 6. Determinación de la capacidad de intercambio catiónico.

2.3.10 Textura

Mediante el método AS-09 de la NOM-021-SEMARNAT-2000, se realizó la determinación de textura de la muestra a través del procedimiento de Bouyoucos. El método requirió la eliminación de la agregación debida a materia orgánica y la floculación debida a los cationes calcio y magnesio. No se eliminan otros cementantes como carbonatos, Imagen 7.



Imagen 7. Determinación de la textura del jal.

2.3.11 Nitrógeno

Se utilizó el método AS-25 de la NOM-021-SEMARNAT-2000 para la determinación de nitrógeno total. Es un método que se basa en el procedimiento semi-Kjeldahl, mediante la extracción del amonio intercambiable por equilibrio de la muestra de jal con ácido sulfúrico (H_2SO_4) y su determinación por destilación en presencia de ácido bórico (H_3BO_3).

Se colocaron 5 g de jal en matraces de digestión. Después se agregaron 1.1 g de mezcla de catalizadores, 6 mL de ácido sulfúrico concentrado y se agitó la muestra. Se calentaron en el equipo digestor a temperatura de 270°C por 3 h. Después de la

digestión se añadieron al matraz 15 mL de agua destilada y la muestra se destiló añadiendo 15 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 10 N, el producto obtenido de la destilación se agregó un matraz Erlenmeyer que contiene 50 mL de H_3BO_4 como indicador. Finalmente, la muestra se tituló con ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.01 N al vire de color rosa fuerte como se muestra en la Imagen 8. Preparándose al mismo tiempo un blanco.

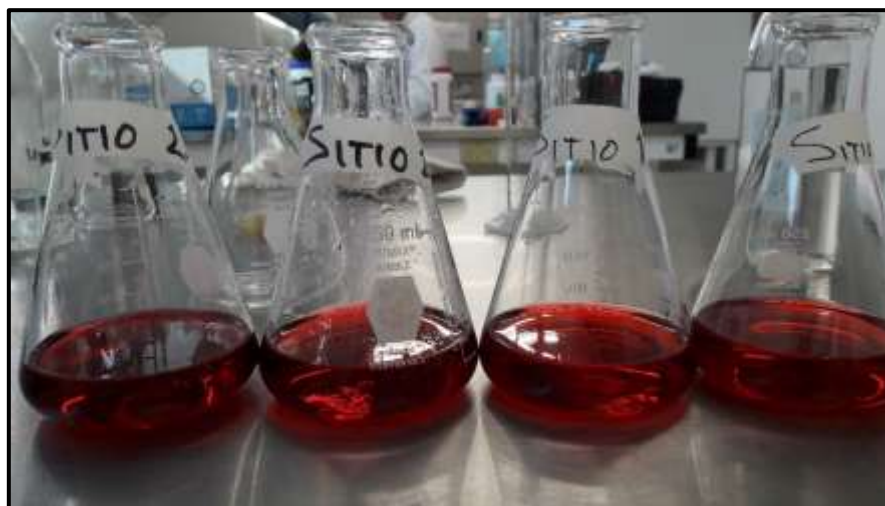


Imagen 8. Determinación de nitrógeno total.

2.4 Cepas proporcionadas

6 cepas identificadas como promotoras de crecimiento vegetal fueron utilizadas para realizar los bioensayos en sustrato orgánico comercial Miracle Grow® y jales: 103, 107 y 129 crecidas en Caldo Rojo Congo; por su parte las cepas 133, 143 y 144 crecidas en Caldo LB (Luria Bertani) las cuales son mostradas en la Imagen 9 y 10 respectivamente.

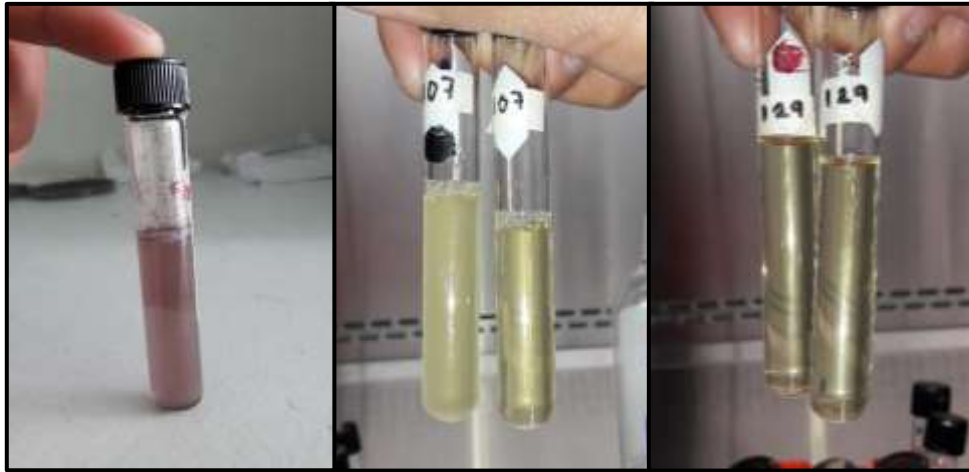


Imagen 9. Inóculos de las cepas 103, 107 y 129.

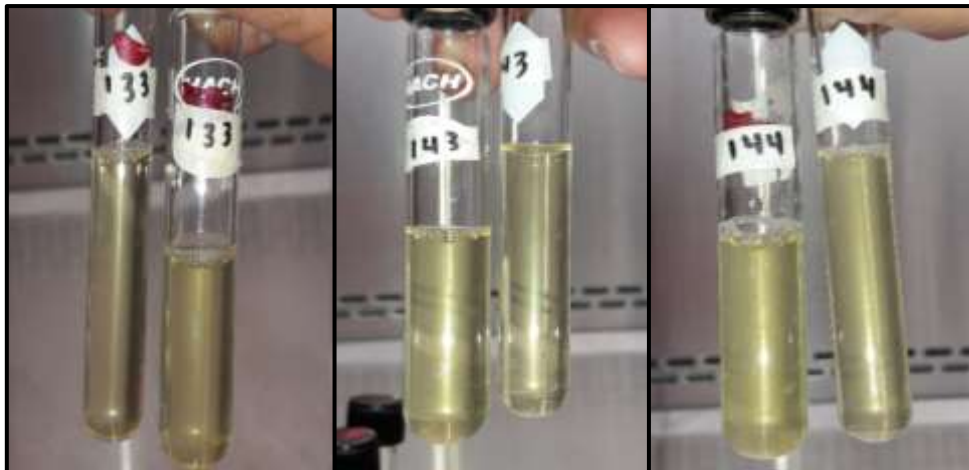


Imagen 10. Inóculos de las cepas 133, 143 y 144.

2.4.1 Propagación y recuperación

Se prepararon medios de cultivo (Caldo LB y Caldo Rojo Congo) para la siembra de inóculos que fueron incubados a 32 °C por 48 horas. Posteriormente se realizó el crecimiento masivo de tubo a matraz y se incubaron durante 48 horas, Imagen 11. Las bacterias se separaron del medio líquido mediante centrifugación a 8000 rpm durante 10 min. El sedimento resultante se resuspendió en Buffer de fosfatos 1M,

Imagen 12, y la suspensión bacteriana se ajustó a 0.5 Å a 600nm para obtener una concentración aproximada de 1×10^9 UFC mL⁻¹.



Imagen 11. Siembra de inóculos.

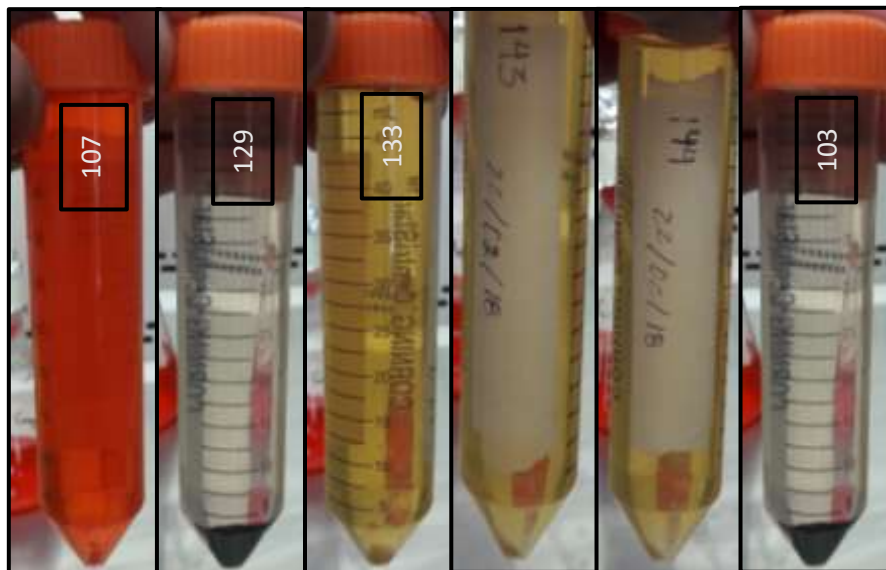


Imagen 12. Recuperación de la biomasa bacteriana.

2.4.2 Siembra de *Ricinus communis* L. y *Helianthus annuus* L. en sustrato orgánico Miracle Grow®

Se probó el desempeño de las 6 cepas bacterianas que fueron positivas a la caracterización bioquímica como bacterias promotoras de crecimiento vegetal, en bioensayos con sustrato orgánico comercial Miracle Grow®. La preparación de las unidades experimentales se realizó por triplicado además de un testigo, las semillas se plantaron y se inocularon con suspensión bacteriana 0.285 Å a 600nm excepto el testigo, el cual fue inoculado con Buffer de fosfatos 1M, Imagen 13. Una vez germinadas las plántulas se inocularon por segunda vez a los 11 días, cada unidad experimental tuvo riego diario y monitoreo del crecimiento a través de la longitud del tallo a lo largo de 30 días.



Imagen 13. Siembra de *Ricinus communis* L. y *Helianthus annuus* L. en sustrato.

2.4.3 Siembra de *Ricinus communis* L. en jales

La preparación de las unidades experimentales se realizó por triplicado además de un testigo, las semillas de Higuera se plantaron en cada unidad experimental que

contenía 500 g de jal con un 5% de sustrato orgánico comercial Miracle Grow®, Imagen 14, se inocularon con suspensión bacteriana 0.5 Å a 600nm excepto el testigo, el cual fue inoculado con Buffer de fosfatos 1M. Una vez germinadas las plántulas se inocularon por segunda vez a los 11 días, tuvieron riego diario y monitoreo del crecimiento a través de la longitud del tallo a lo largo de 30 días.



Imagen 14. Siembra de *Ricinus communis* L. en jales.

2.5 Determinación de los parámetros de crecimiento

A los 30 días, cada planta se retiró cuidadosamente de la maceta y la raíz se enjuagó varias veces con agua destilada estéril. Las partes de la planta se clasificaron como aéreas (tallos y hojas) y subterráneas (raíces). El crecimiento de la planta se evaluó midiendo la altura del tallo, la longitud y volumen de desplazamiento de la raíz y el peso húmedo y seco de la biomasa.

2.6 Porcentaje de germinación de las plantas inoculadas con BPCV

Se llevó un registro de cada una de las unidades experimentales para ambas siembras (en sustrato orgánico comercial Miracle Grow® y jal) verificando el número de semillas que germinó y finalmente se identificaron aquella(s) que presentaron el mejor rendimiento.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de las características fisicoquímicas del jal

De acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000, se obtuvieron los siguientes resultados después de haber realizado la caracterización fisicoquímica a la muestra de jal y se presentan en la Tabla 1. Con estos valores se pueden conocer sus características y cuáles pueden ser sus impactos al suelo, ya que es el principal medio que está en contacto directo con estos residuos porque ahí son depositados.

La pasta saturada embebió 42.4797g de agua/100 g de jal seco, notando que tiene una buena capacidad de retención y esto se debe a la textura que presenta, ya que las arcillas son las que retienen más agua.

Extracto de saturación y pasta saturada	pH de la muestra de jal en solución de agua pura y CE	Carbonatos	Bicarbonatos	Cloruros	Calcio	Magnesio	Acidez extraíble	CIC	Textura	Nitrógeno
-pH: 8.26 -CE: 3000 µS/cm -42.4797g de agua /100 g de jal seco	-7.2 -2140 µS/cm	N/D	N/D	35 meq/L	48 meq/L	39.15 meq/L	0.018 meq/L	0.000084 Cmol/kg	Franco arenoso arcilloso	0.00056%

Tabla 1. Características fisicoquímicas del jal minero de Zimapán, Hidalgo.

El pH es el factor más influyente en la movilización de metales debido a las reacciones de hidrólisis de los cationes, provocando un aumento de la solubilidad y por tanto de su movilidad de forma inversamente proporcional al pH del jal; de tal manera que a pH neutros y básicos se encuentran minerales poco solubles (Ramos, M., *et al.*, 2012), el extracto de saturación presentó un carácter ligeramente básico con un pH de 8.26 mientras que la muestra de jal en solución de agua destilada presentó un pH de 7.2, esto indica que las condiciones de la muestra tienden a ser neutras y respecto a estos valores obtenidos permiten conocer que actualmente los jales no son generadores de drenaje ácido atribuyese también la ausencia de carbonatos y bicarbonatos (Pérez, I., & Romero, F.M. 2015) por lo que los metales pesados se encuentran menos disponibles ya que las formas químicas se refieren a aquellas menos solubles (Medel, A., *et al.*, 2008).

Así mismo, la conductividad eléctrica del extracto de saturación presentó un valor de 3000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y para la muestra de jal un valor de 1240 $\mu\text{S}/\text{cm}$, estos valores relativamente altos pueden ser explicados por la presencia de sulfuros metálicos como la pirita, esfalerita y galena producto del proceso natural de oxidación y el paso del tiempo, los cuales pueden llegar a generar acidez en los residuos y estos mismos han sido reportados como minerales conductores de electricidad (Campbell, D., & Fitterman, D. 2000) además de ser la fuente primaria de los EPT como As, Cd, Cu, Pb, Fe y Zn, estos minerales pueden ser clasificados como paramagnéticos y buenos conductores de electricidad, o por sus sales solubles residuales que son utilizadas como depresores en el proceso de flotación selectiva (Pérez, I., & Romero, F.M. 2015). La baja capacidad de intercambio catiónico que presenta la muestra favorece la posibilidad de movilización de los metales presentes en la misma; sin embargo, la baja solubilidad de los metales a pH alcalino limita severamente su movilidad. Las concentraciones de sulfuros implican una muy baja probabilidad de generación de acidez, lo cual coincide con el pH obtenido en la muestra analizada y utilizada en este proyecto (Ramos, M., *et al.*, 2012).

El contenido de materia orgánica presente fue muy bajo, lo cual fue evidente al realizar su eliminación con peróxido de hidrógeno, ya que para la determinación de la textura fueron necesarios sólo dos ataques. La clase textural que presenta la muestra corresponde al tipo Franco arenoso arcilloso de acuerdo con los criterios de clasificación manejados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA) basado en los porcentajes de arena, limo y arcilla obtenidos de la determinación. Este tipo de clase textural se relaciona con una baja porosidad y con densidad aparente mayor, reflejándose en un ambiente impropio para la penetración radical y, por ende, en una baja fertilidad natural (Hernández, A., *et al.*, 2009) lo cual coincide con la naturaleza propia del jal minero.

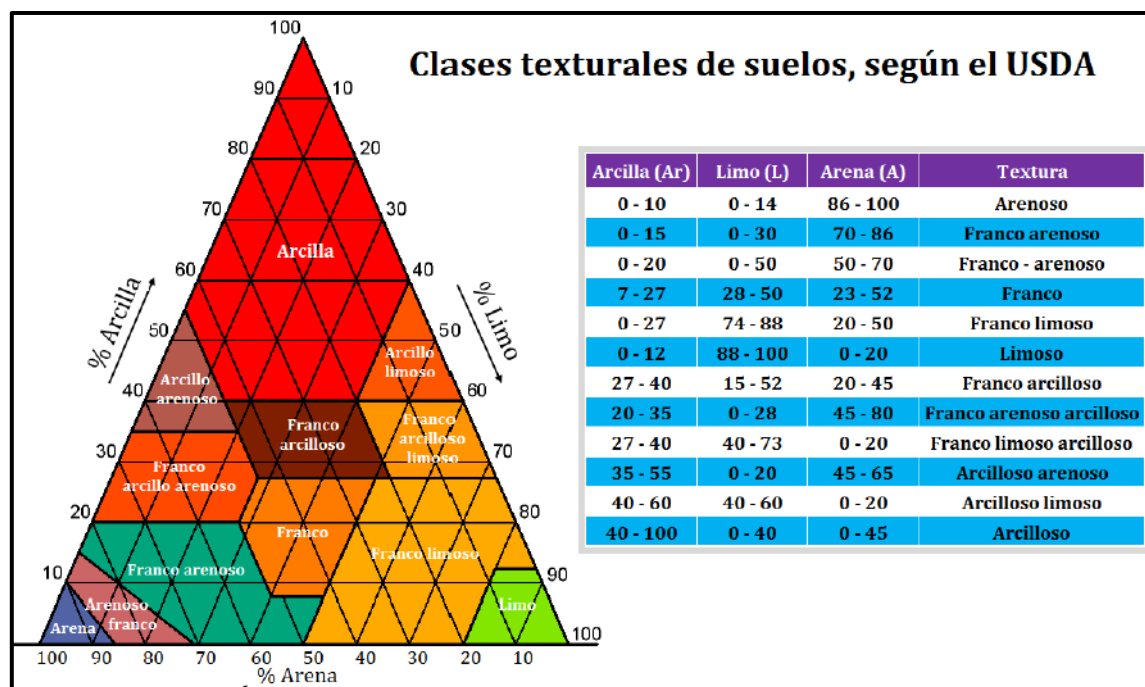


Figura 3. Clases texturales (USDA).

Los contenidos de nitrógeno, calcio y magnesio que presenta la muestra no son adecuados para favorecer el desarrollo de la cubierta vegetal, estos valores fueron bajos ya que el porcentaje de nitrógeno presente en la muestra es extremadamente pobre, de acuerdo con los criterios de (Moreno 1978), como se puede observar en la Tabla 2. La importancia que tienen estos elementos radica en mayor medida en

que son necesarios para el desarrollo de las plantas y que sus requerimientos dependen directamente del tipo de especie vegetal que se desarrolla en el sitio (Castellanos, *et al.*, 2000).

Categoría	Valor (%) de nitrógeno en suelo
Extremadamente pobre	< 0.032
Pobre	0.032 - 0.063
Medianamente pobre	0.064 - 0.095
Medio	0.096 - 0.126
Medianamente rico	0.127 - 0.158
Rico	0.159 - 0.221
Extremadamente rico	> 0.221

Tabla 2. Criterios para evaluar contenido de nitrógeno total (Moreno, 1978).

3.2 Determinación de los parámetros de crecimiento

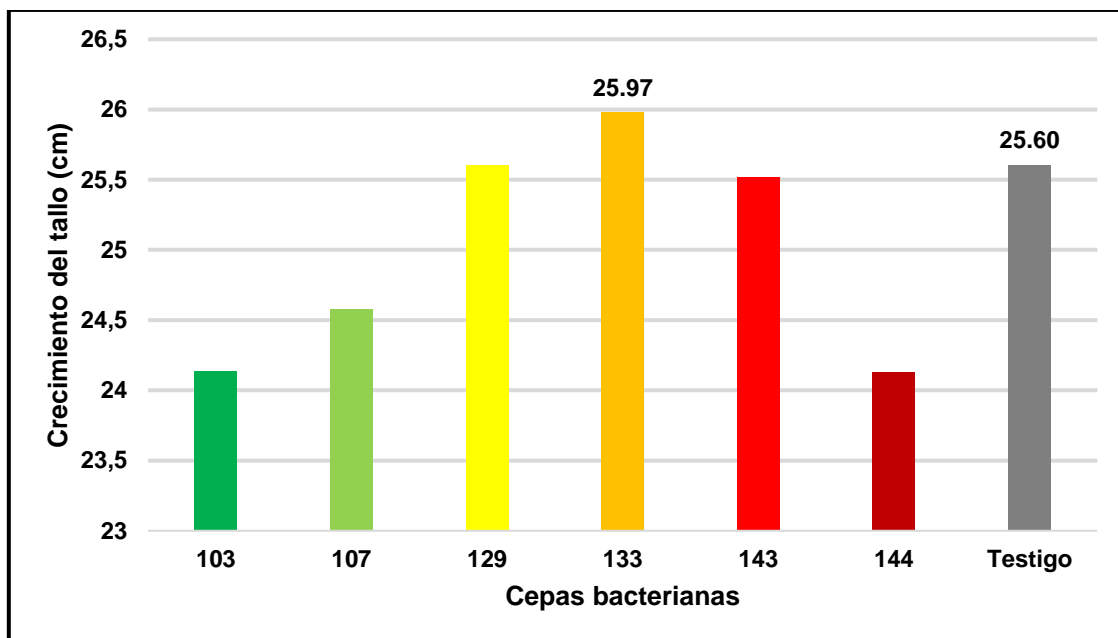
Los parámetros de crecimiento vegetal que se consideraron fueron la medición física diaria del tallo de las plantas para ambos experimentos (en sustrato orgánico comercial Miracle Grow® y jal) y la medición de tallo y raíz con ayuda del software Image Tool 3, después de haber realizado la extracción de las plantas de cada una de las unidades experimentales a los 30 días. Posteriormente se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de los datos con ayuda del software estadístico SPSS versión 22.0, aplicando el estadístico Tukey Kramer con un intervalo de confianza $\alpha = 95\%$ para determinar las diferencias significativas que existen entre las cepas bacterianas utilizadas respecto al testigo.

Las mediciones de las plantas de Higuierilla y Girasol se realizaron después de haber germinado durante las fechas del mes de Abril; para Higuierilla se

contemplaron 8 días debido a que esta demora más tiempo en germinar mientras que para Girasol fueron 15 días.

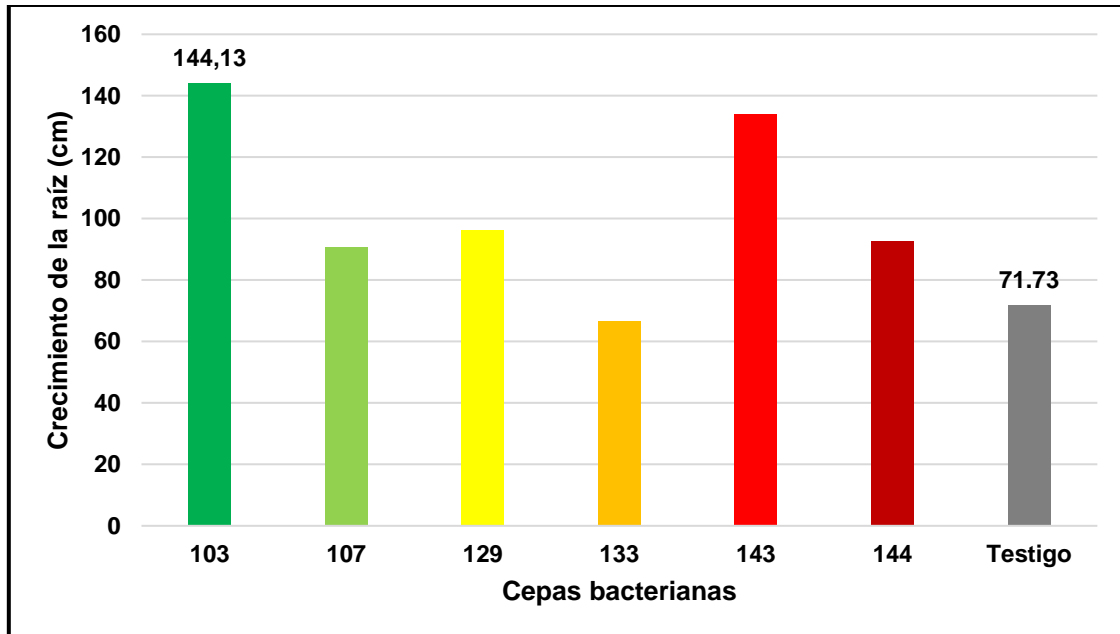
Utilizando el software Image Tool 3, se realizó la medición del tallo y raíz de las plantas de Higuierilla y Girasol, las cuales fueron sembrados en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®, para posteriormente sembrar únicamente Higuierilla en jal e inoculadas con cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal, esto debido a la mejor adaptabilidad que presenta la planta a la presencia de estresores, en este caso los metales pesados. Posteriormente se realizó el análisis estadístico para determinar las diferencias significativas de las cepas respecto al testigo.

Respecto del crecimiento del tallo, en la Gráfica 1 se aprecia que la cepa 133 tuvo una mejor influencia en el desarrollo de la planta de Girasol en comparación a las demás cepas y principalmente al testigo. De esta manera se observa que existe una mejor promoción del crecimiento vegetal, notándose diferencias significativas (con $\alpha=95\%$).



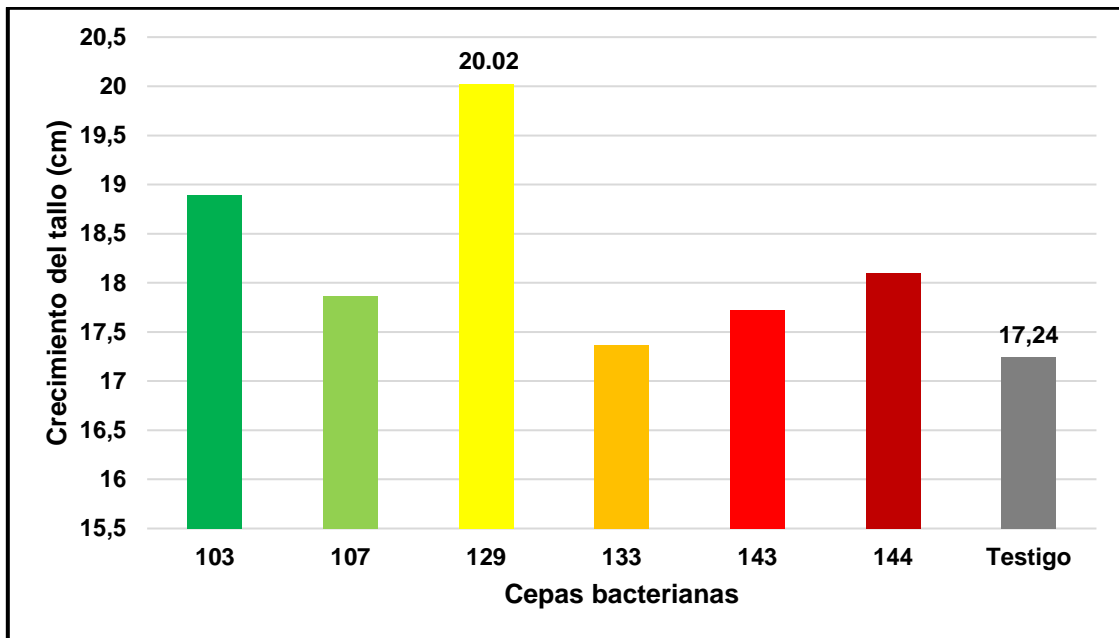
Gráfica 1. Crecimiento del tallo de Girasol en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®

Por otra parte, la cepa 103 fue la que mejor influyó en el crecimiento de la raíz de la planta de Girasol como se puede observar en la Gráfica 2, de esta manera se afirma que dicha cepa fue la que mejor promovió el crecimiento vegetal notándose una diferencia significativa (con $\alpha=95\%$) respecto al testigo y a las demás cepas utilizadas.



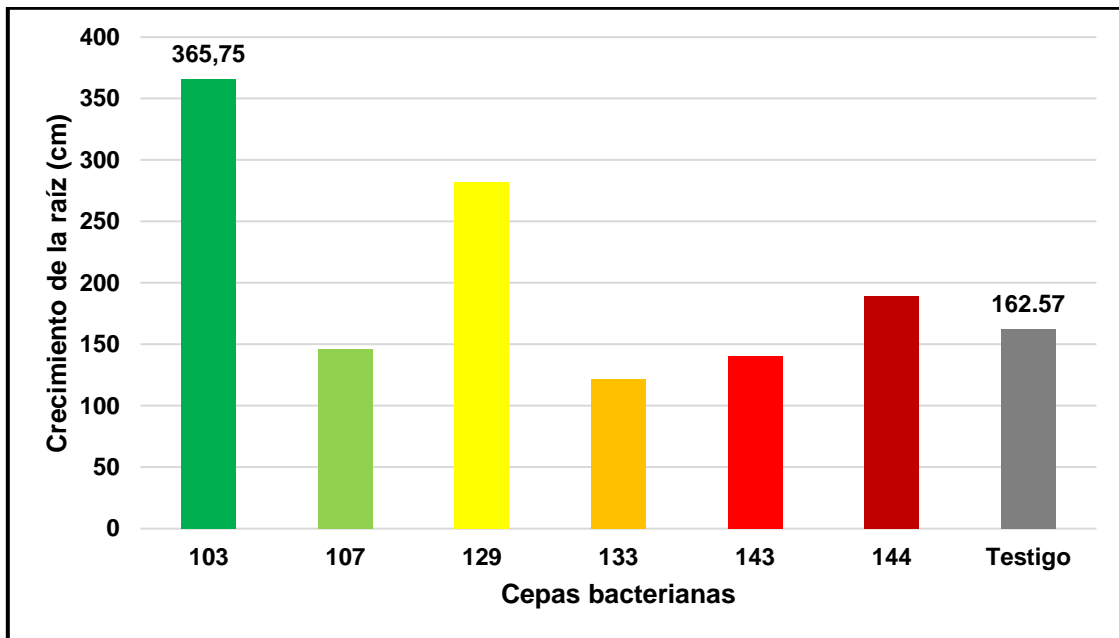
Gráfica 2. Crecimiento de la raíz de Girasol en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®

En la Gráfica 3 se muestra el crecimiento del tallo de la planta de Higuierilla sembrada en sustrato orgánico comercial Miracle Grow® y al realizar el análisis de los datos se observa que la cepa 129 presenta una diferencia significativa (con $\alpha=95\%$) respecto al testigo y a las demás cepas que se utilizaron, en este caso esta cepa fue la que mejor promovió el crecimiento vegetal y desarrollo del tallo en la planta.



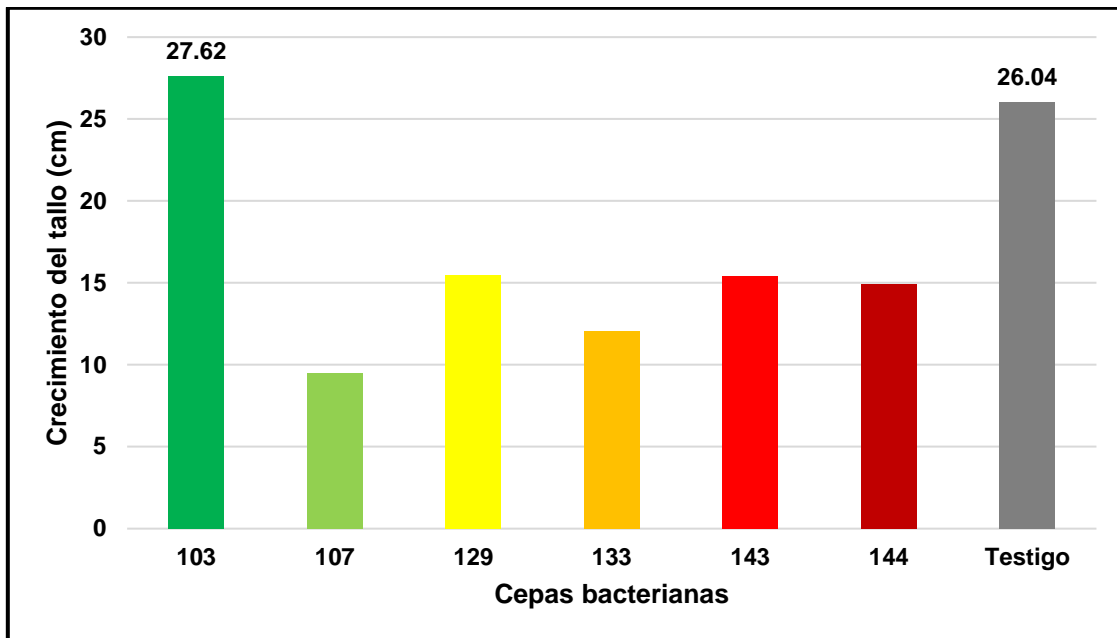
Gráfica 3. Crecimiento del tallo de Higuierilla en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®

De la Gráfica 4, se observa que la cepa 103 tuvo una gran influencia en el crecimiento de la raíz de la planta de Higuierilla sembrada en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®, esto se debe a la promoción del crecimiento vegetal que aporta la cepa estimulando el desarrollo de la biomasa de la planta por medio de la actividad microbiana realizada en la rizosfera. Realizando el análisis estadístico de los datos se reafirma que la cepa 103 presenta una diferencia significativa (con $\alpha=95\%$) respecto al testigo y a las demás cepas utilizadas.



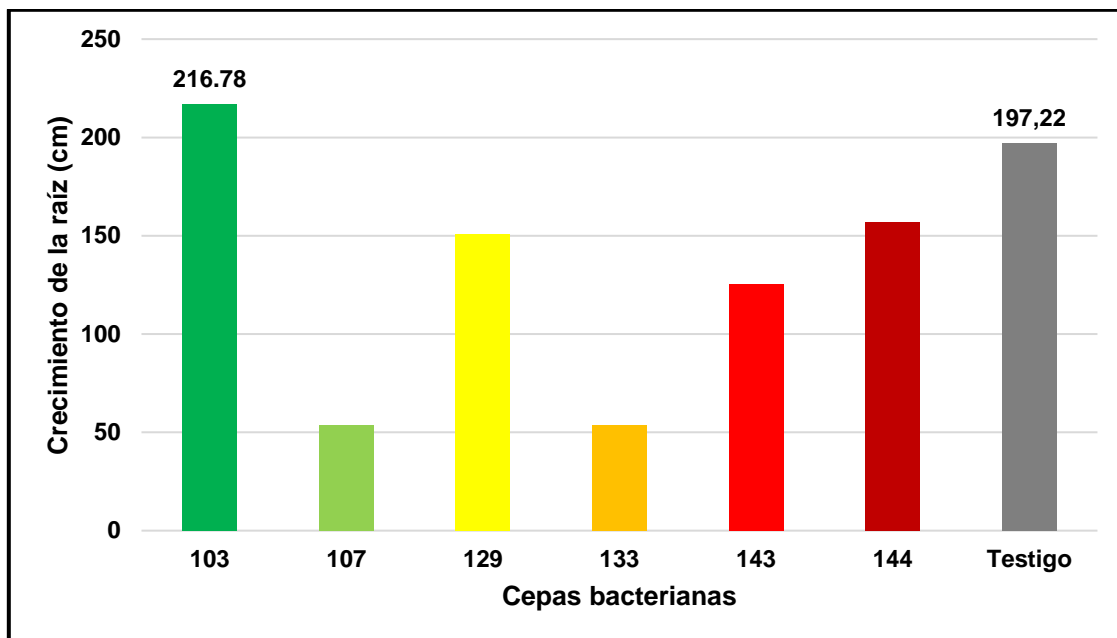
Gráfica 4. Crecimiento de la raíz de Higuierilla en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®

Como se puede observar en la Gráfica 5 se muestra el crecimiento del tallo de la planta de Higuierilla sembrada en jal, donde la cepa 103 es la que mejor eficiencia presenta en el incremento y desarrollo de la biomasa de la planta debido a que la actividad microbiana proporciona grandes ventajas para soportar el estrés ante EPT que se encuentran en este tipo de residuos mineros notándose una diferencia significativa (con $\alpha=95\%$) al realizar el análisis estadístico respecto al testigo y a las demás cepas utilizadas.



Gráfica 5. Crecimiento del tallo de Higuierilla en jal

La Gráfica 6 muestra el crecimiento de la raíz de la planta de Higuierilla sembrada en jal y la cepa que mejor funcionó fue la 103 respectivamente, aportando una buena promoción de crecimiento vegetal en la parte de la rizosfera, resultado de la actividad microbiana y los metabolitos secretados por estas mismas bacterias para ayudar a la planta a soportar condiciones anómalas en presencia de estresores. Con el análisis estadístico de los datos se confirma que existe una diferencia significativa (con $\alpha=95\%$) respecto al testigo y a las demás cepas utilizadas.



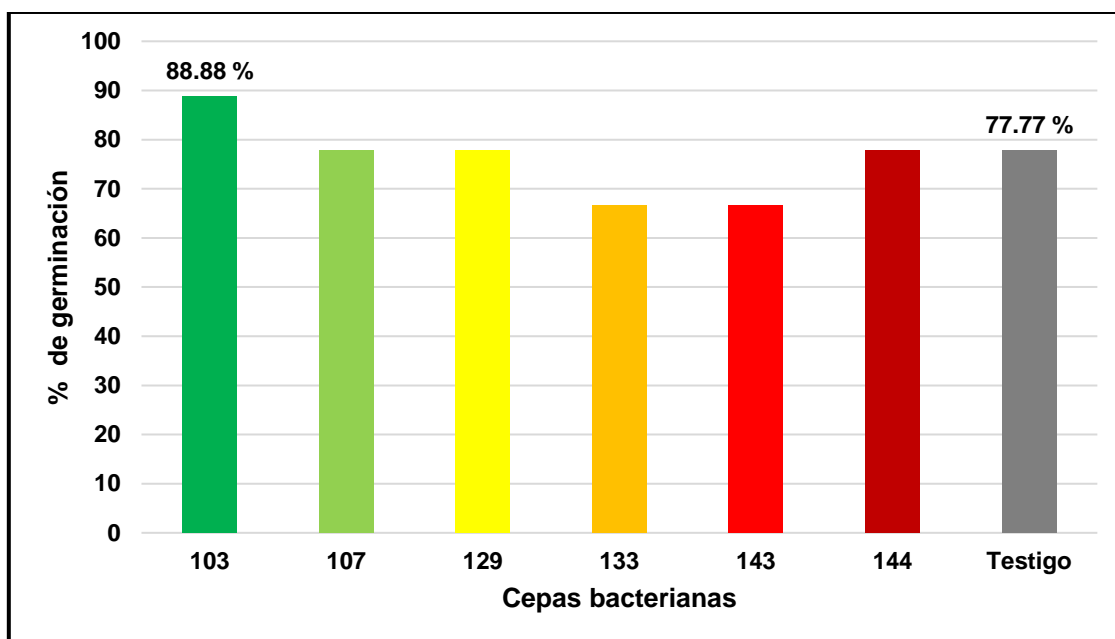
Gráfica 6. Crecimiento de la raíz de Higuierilla en jal.

Como resultado final se obtuvo que la cepa 103 presentó un gran desempeño en ambos experimentos, y principalmente en jal ya que las bacterias utilizadas tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal de la planta propiciado que esta tenga un mejor desarrollo en ambientes con presencia de estresores, en este caso con EPT. Realizando el análisis estadístico de los datos esta cepa presenta diferencias significativas (con $\alpha=95\%$) respecto a los testigos y a las demás cepas utilizadas tanto para el crecimiento de la raíz en sustrato orgánico comercial Miracle Grow® y jal, como para el crecimiento de tallo en jal. A excepción de la cepa 129 la cual presentó diferencias significativas con respecto al testigo en el crecimiento del tallo para la planta de Higuierilla sembrada en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®.

3.3 Porcentaje de germinación de las plantas inoculadas con BPCV

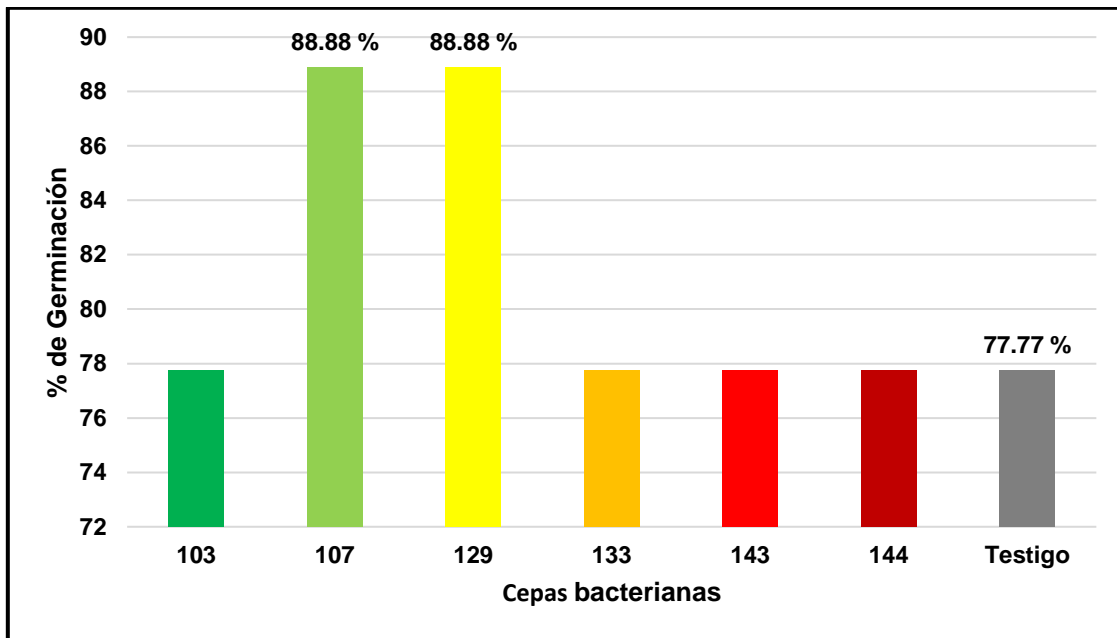
Con base en los datos obtenidos del porcentaje de germinación, se puede observar en la Gráfica 7 que la cepa 103 fue la que influyó en el mayor porcentaje de semillas

germinadas para la planta de Girasol, es decir el mayor número de semillas germinadas que fueron sembradas en sustrato y respecto a esto la influencia que tiene la cepa para el desarrollo de la planta y la producción de giberelina, la cual es una fitohormona que se encarga de interrumpir el periodo de latencia de las semillas haciéndolas germinar.



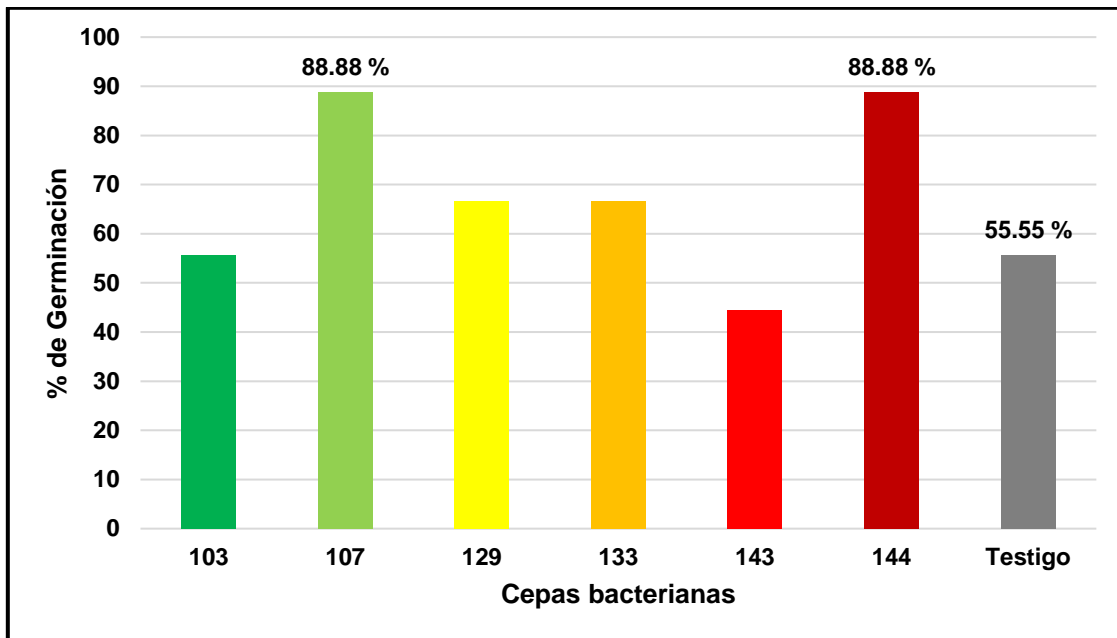
Gráfica 7. Porcentaje de germinación de semillas de Girasol en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®

Por su parte, los datos obtenidos del porcentaje de germinación de las semillas de Higuierilla se muestran en la Gráfica 8, donde se logra apreciar aquellas que fueron sembradas en sustrato orgánico comercial Miracle Grow® y que germinaron en mayor cantidad debido a la influencia que presentaron las cepas 107 y 129 con una diferencia del 10% respecto al testigo y a las demás cepas utilizadas.



Gráfica 8. Porcentaje de germinación de semillas de Higuierilla en sustrato orgánico comercial Miracle Grow®

Los datos obtenidos del porcentaje de germinación de las semillas de Higuierilla sembradas en jal se muestran en la Gráfica 9, las cepas que mejor funcionaron respecto a esto fueron la 107 y 144 ambas con un mismo porcentaje de germinación y con una diferencia del 33% respecto al testigo, con esto se afirma que estas cepas utilizadas produjeron la fitohormona giberelina para hacer germinar a las semillas interrumpiendo su periodo de latencia.



Gráfica 9. Porcentaje de germinación de semillas de Higuierilla en jal.

Conclusiones

Las características fisicoquímicas que presenta la muestra de jal analizada son las siguientes:

El pH que tiene dicha muestra tiende a ser neutro siendo un factor muy influyente en la movilización de los metales pesados pero bajo estas condiciones los jales analizados no son generadores de drenaje ácido y por esto mismo presentan ausencia de carbonatos y bicarbonatos. La conductividad eléctrica explica la presencia de sulfuros metálicos y la baja capacidad de intercambio catiónico favorece la posibilidad de movilización de los metales pero esta misma se limita por las concentraciones de sulfuros y por el pH obtenido. Por otra parte, la clase textural presentada implica una baja porosidad y una densidad aparente mayor, lo cual es un ambiente impropio para la penetración radical y una baja fertilidad natural, esto mismo coincide con la naturaleza misma del jal minero. Y por último los contenidos de N, Ca y Mg presentes en la muestra no son adecuados para favorecer el

desarrollo de la cubierta vegetal debido a que son extremadamente pobres, ya que la importancia de estos elementos radica en mayor medida para el crecimiento de las plantas.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos realizados con sustrato orgánico comercial Miracle Grow® se tiene que:

Para la planta de Girasol, la cepa 133 fue la que presentó un mejor crecimiento en el tallo, mostrando así una mejor influencia en el incremento de su biomasa mientras que para el crecimiento de la raíz la cepa 103 resultó ser la más eficiente en el desarrollo, respecto al testigo y las demás cepas utilizadas.

Con respecto a la planta de Higuera en el experimento con sustrato orgánico comercial Miracle Grow®, el mejor crecimiento del tallo lo presentó la cepa 129 teniendo una mejor promoción del crecimiento vegetal, esto favorecido por la actividad microbiana y la producción de metabolitos. Para el experimento con jalisco, la cepa 103 fue la que presentó mejor promoción del crecimiento vegetal; en el caso del crecimiento de la raíz.

De esta manera se concluye que la cepa 103 en ambos experimentos ha demostrado sus capacidades como bacteria promotora del crecimiento vegetal ayudando al crecimiento de las plantas bajo condiciones de estrés en presencia de jales mineros ya que contribuyó al desarrollo de la raíz y del tallo en ambos experimentos. A excepción de la cepa 129 que presentó influencia sobre el crecimiento del tallo de la planta de Higuera sembrada en sustrato orgánico Miracle Grow®.

El uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en los procesos de fitorremediación tienen influencia en el desarrollo y aumento de la biomasa de las plantas debido a que estos microorganismos son capaces de producir metabolitos

como el Ácido Indolacético (AIA) el cual es hormona vegetal denominada auxina que promueve y provoca el desarrollo de las raíces y estimula el desarrollo de los frutos; los sideróforos que son transportadores y compuestos quelantes de hierro secretados por los mismos microorganismos, y la giberelina que es una fitohormona cuya función principal es interrumpir el periodo de latencia de las semillas, haciéndolas germinar.

Bibliografía

1. Agudelo, L., & Macias, K., & Suárez, A. (2005). *Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos*. Revista Lasallista de Investigación, 2 (1), 57-60.
2. Campbell, D., & Fitterman, D. (2000). *Geoelectrical methods for investigating mine dumps, In Proceedings of the Fifth International Conference on Acid Rock Drainage, Inc.* Denver Colorado, Society for Mining, Metallurgy and Exploration, v. II, 1513-1523.
3. Carpena, R., y Bernal, M. (2007). *Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos*. Asociación Española de Ecología Terrestre. Ecosistemas 16 (2):1-3.
4. Carrillo, R., & González, M.C.A. (2017). *Impacto de la minería sobre los recursos naturales*. Agroproductividad: Vol. 10. Núm. 4.
5. Castellanos, J.Z., & Uvalle, J.X., & Aguilar, A. (2000). *Manual de Interpretación de Análisis de Suelos y Aguas*. 2ª Edición. Instituto de Capacitación para la Productividad Agrícola. San Miguel de Allende, Gto. 226 p.
6. Chico, J., Cerna, L., Rodríguez, M., & Guerrero, M. (2012). *Capacidad remediadora de la raíz de girasol, Helianthus annuus, cuando es sometida a diferentes concentraciones de plomo*. Revista Científica de La Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Perú., 32 (2), 13–19.

7. Coll, A., Sánchez, M.T., & Morales, J. (2002). *LA MINERÍA EN MÉXICO, geografía, historia, economía y medio ambiente. I.5.2*. Instituto de Geografía, UNAM.
8. Covarrubias, S. A., & Peña Cabriales, J. J. (2017). *Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 7–21.
9. Delgadillo, A., González, C., Prieto, F., Villagómez, J.R., and Otilio Acevedo, O. (2011). *Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14: 597-612.
10. Environmental Law Alliance Worldwide (ELAW). (2007). *Vista general de la actividad minera y sus impactos*.
11. EPA. (2000). *Introduction to Phytoremediation*. EPA 600-R-99-107.
12. García, F. (2012). *La minería en México. Espacios para el capital a cielo abierto*. *Theomai*, (25), 128-136.
13. García, C., Moreno, J.L., Hernández, M.T., Polo, A. (2002). *Metales pesados y sus implicaciones en la calidad del suelo*. *Ciencia y Medio Ambiente-CCMA-CSIC*, 125-138.
14. Hernández, A., & Mondragón, E., & Cristobal, D., & Rubiños, J.E., & Robledo, E. (2009). *VEGETACIÓN, RESIDUOS DE MINA Y ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS DE UN JAL DE PACHUCA, HIDALGO, MÉXICO*. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 15 (2). 109-114.
15. Kidd, P.S., Becerra, C., García, M., Monterroso, C. (2007). *Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género Alyssum L.* *Asociación Española de Ecología Terrestre. Ecosistemas* 16 (2): 26-43.
16. Medel, A., & Ramos, S., & Avelar, F., & Mora, L., & Rodríguez, F. (2008). *Caracterización de Jales Mineros y Evaluación de su Peligrosidad con Base en su Potencial de Lixiviación*. *Conciencia Tecnológica*, (35), 32-35.

17. Menéndez, M.T., & Civera, M. (2011). *MINERÍA Y ENFERMEDAD EN LOS HABITANTES DE ZIMAPÁN, HIDALGO*. Estudios de Antropología biológica, XV: 95-116, México, 2011, ISSN 1405-5066.
18. Moreno, R., Monroy, M.G., y Castañeda, E.P. (2009). *Evaluación geoquímica de residuos mineros (jales o colas) de mineralización de tipo epitermal, Hidalgo, México*. Revista Geológica de América Central, 41: 79-98.
19. Moreno, R., Téllez, J., y Monroy, M.G. (2012). *Influencia de los minerales de los jales en la bioaccesibilidad de arsénico, plomo, zinc y cadmio en el distrito minero Zimapán, México*. Rev. Int. Contam. Ambie. 28 (3) 203-218.
20. Muñoz, J. (1986). *La minería en México. Bosquejo histórico*. Universidad Complutense de Madrid, (11), 145–156.
21. Oyarzún, R., Higuera, P., & Lillo, J. (2011). *Minería Ambiental. Una introducción a los Impactos y su Remediación*. GEMM - Aula2punto.net, 1–337.
22. NOM-021-SEMARNAT-2000. *Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis*.
23. Noriega, L., & Lara, E., & Serafín, A.H., & Gutiérrez, N.L., & Ávila, M. (2016). *CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE RESIDUOS MINEROS Y EVALUACIÓN DE SU PELIGROSIDAD*. Revista Mexicana de Agroecosistemas. Vol. 3(2): 175-183, 2016.
24. Ortiz, H.G., Trejo, R., Valdez, R.D., Arreola, J.G., Flores, A., y López, B. (2009). *Fitoextracción de plomo y cadmio en suelos contaminados usando quelite (Amaranthus hybridus L.) y micorrizas*. 15 (2), 161–168.
25. Perea, Y.S., Carrillo, R., González, M.C.A. (2017). *Fitorremediación asistida por microorganismos: énfasis en bacterias promotoras del crecimiento de plantas*. Agroproductividad: Vol. 10. Núm. 4.
26. Pérez, I., & Romero, F.M. (2015). *Uso de parámetros indirectos para la evaluación de la contaminación de suelos por metales pesados en una zona minera de San Luis Potosí, México*. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana. Volumen 67, Núm. 1, 2015, P. 1-12.

27. Puga, S., Sosa, M., Legué, T., Quintana, C., & Campos, A. (2006). *Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera*. Ecol. Pal. Vol. 5 nº 1 y 2, pp. 149-155.
28. Prapagdee, B., Chanprasert, M., & Mongkolsuk, S. (2013). *Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by Helianthus annuus*. Chemosphere, 92 (6), 659–666.
29. Ramos, M., & Avelar, J., & Medel, A., & Yamamoto, L., & Godínez, L., & Ramírez, M., & Guerra, R., & Rodríguez, F. (2012). *MOVILIDAD DE METALES EN JALES PROCEDENTES DEL DISTRITO MINERO DE GUANAJUATO, MÉXICO*. Rev. Int. Contam. Ambie. 28 (1) 49-59, 2012.
30. Rómulo, H., Tapia, L.M., Teniente, R., González, A., Hernández, M., Solís, J.L., y Zamarripa, A. (2011). *Guía para cultivar higuierilla (Ricinus communis L.) en Michoacán*. Folleto Técnico Núm. 1. INIFAP-CIRPAC Campo Experimental Valle de Apatzingán.
31. Ruiz, E. y Armienta, M. (2012), *Acumulación de arsénico y metales pesados en maíz en suelos cercanos a jales o residuos mineros*. Rev. Int. Contam. Ambie. 28 (2) 103-117, 2012.
32. Sepúlveda, V.T., Velasco A.J., de la Rosa Pérez, T. & D.A. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. Primera Ed., México.
33. Servicio Geológico Mexicano. (2008). *INVENTARIO FÍSICO DE LOS RECURSOS MINERALES DEL MUNICIPIO DE ZIMAPÁN, ESTADO DE HIDALGO*. FIDEICOMISO DE FOMENTO MINERO (FIFOMI).
34. Servicio Geológico Mexicano. (2016). *Panorama Minero del Estado de Hidalgo*.
35. Servicio Geológico Mexicano. (2017). *Anuario estadístico de la Minería Mexicana, 2016*.

36. Servicio Geológico Mexicano. (2014^b). Mining Metallurgical Production. *Statistical Yearbook of the Mexican Mining, 2013* (p.139). Hidalgo, México: SE.
37. Shivashankara, K. S. (2016). *Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops*. 1 (5) 85-102.
38. Tchounwou, P., Yedjou, C., Patlolla, A., and Sutton, D. (2012). *Heavy Metals Toxicity and the Environment*. National Institutes of Health, 101: 133–164.
39. Xia, H. Cai, X. (2002). *Ecological restoration technologies for mined lands*. Chinese Journal of Applied Ecology, 13: 1471–1477.
40. Yashim, Z. I., Agbaji, E. B., Gimba, C. E., and Idris, S. O. (2016). *Phytoremediation Potential of Ricinus communis L. (Castor Oil Plant) in Northern Nigeria*. International Journal of Plant & Soil Science 10(5): 1-8, Article No. IJPSS.21680.